

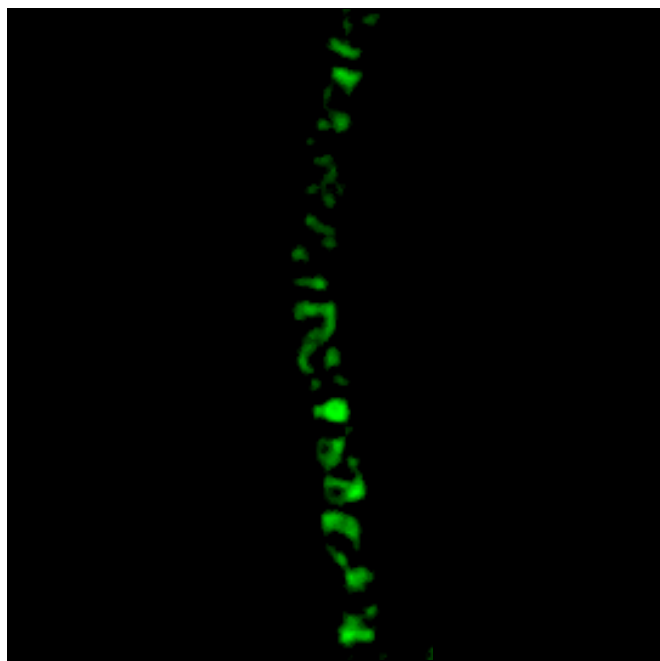
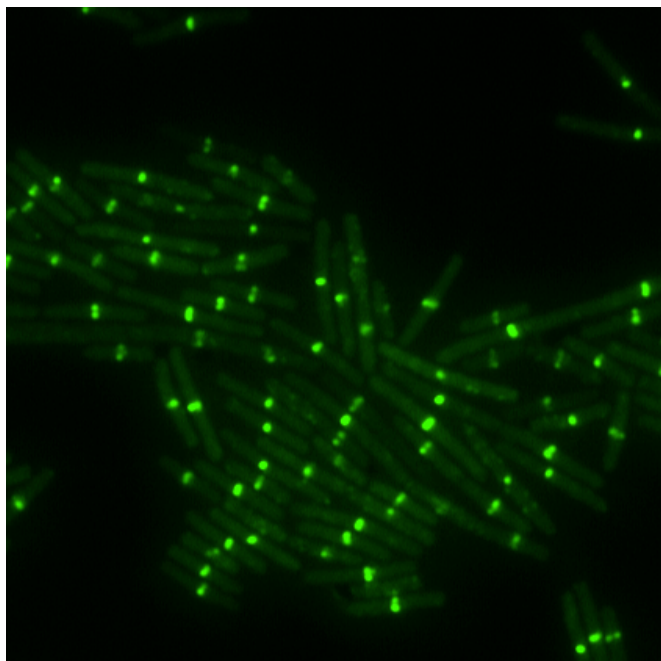
Estudio funcional de las proteínas p1 y p17 del bacteriófago ϕ 29

Tesis Doctoral
David Ballesteros Plaza
Madrid, 2014

Departamento de Biología Molecular
Universidad Autónoma de Madrid

Estudio funcional de las proteínas p1 y p17 del bacteriófago $\phi 29$

Tesis Doctoral
David Ballesteros Plaza
Madrid, 2014





Memoria de investigación presentada por David Ballesteros Plaza para optar al grado de Doctor en Biología Molecular por la Universidad Autónoma de Madrid.

El trabajo recopilado en esta memoria ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC/UAM), en el grupo de Replicación del DNA del bacteriófago $\phi 29$, bajo la dirección de la Dra. Margarita Salas Falgueras y del Dr. Daniel Muñoz Espín. Para ello se contó con una ayuda de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Ciencia e Innovación y un contrato de la Comunidad de Madrid.

A mis padres, Asun y Saturio.

A mis ángeles, Ana y Eva.

*“Lo importante es no dejar de hacerse preguntas;
la curiosidad tiene su propia razón de existir.”*

Albert Einstein

*“Estoy absolutamente convencido de que la ciencia y la paz
triunfan sobre la ignorancia y la guerra, que las naciones
se unirán a la larga no para destruir sino para edificar, y
que el futuro pertenece a aquellos que han hecho mucho
por el bien de la humanidad.”*

Louis Pasteur

*“En realidad, prefiero la ciencia a la religión.
Si me dan a escoger entre Dios y el aire
acondicionado, me quedo con el aire.”*

Woody Allen

Durante la realización de esta tesis han sido muchas las personas con las que he compartido laboratorio y quería agradecerles su ayuda y amistad.

En primer lugar me siento muy agradecido a Margarita por haberme dado la oportunidad de formarme en su grupo de investigación, por dedicarme su tiempo a pesar de lo ocupada que está y por dirigirme con rigor y paciencia.

A Dani, por su dirección de tesis, su apoyo constante y su buena disposición conmigo. Sin su ayuda, gran parte de esta tesis no habría sido posible.

A Gemma, por su ayuda en los experimentos de fraccionamiento celular y de solubilización con Triton X-114.

De entre todos los compañeros de laboratorio, tengo un agradecimiento muy especial para Isabel, por sus ayudas inestimables en los experimentos, por sus consejos siempre acertados o por los préstamos de reactivos. Tampoco olvido nuestras disertaciones de poyata, entre muchas otras cosas.

A Eugenia y a Laura, por todo el tiempo compartido, por sus ayudas en el día a día, por su amabilidad conmigo, porque sé que siempre puedo contar con ellas y por los momentos dentro y fuera del laboratorio.

A Nadine, en sus idas y venidas, por sus comentarios acertados y la sensación de bienestar que me infunde, además de las sorpresas dulces que nos regala.

A Marina, con quien he pasado muy buenos momentos, sobre todo en la etapa de escritura de la tesis.

A Irene, porque es un placer hablar con ella. Siempre encuentra el lado positivo.

A José Mari, porque siempre tiene un momento para echarte una mano, por sus ideas, por su conocimiento acumulado y porque lo sabe transmitir, por sus purificaciones de proteínas y por resolver mis dudas.

A Laurentino, por sus préstamos de medios de cultivo, por sus purificaciones de fagos y de proteínas, por su ayuda para abrir la tapa de los botes de centrífuga (“¡hay que desayunar más!”) y por su compañía durante la comida y en otros momentos.

A María Ángeles, cuya amabilidad no resta un ápice a su eficiencia resolviendo trámites burocráticos.

A Miguel, Mario y Modesto, que con sus comentarios y consejos han colaborado en la planificación de algún experimento o en el análisis de resultados. En especial a Miguel, porque es muy constructivo hablar con él, a Mario por su ayuda en el experimento de *pull-down* y a Modesto por ayudarme con el análisis estadístico.

A Alicia Bravo, con la que nunca olvidaré mis inicios en el grupo de $\phi 29$.

A Víctor, cuyos consejos acertados vienen con una dosis de altura, que me enriquece.

A Benito, por su apoyo, sobre todo en los inicios, y por su sentido del humor.

A todos los compañeros con los que he tenido el placer de compartir laboratorio, celebraciones de tesis y “salidas nocturnas”: Pablo, Alicia, Ana, Mónica, Olga, Patricia, Elisa, Virginia, Laura Pérez, Ana Camacho y Martín. Todos ellos me han aportado algo y guardo un buen recuerdo. En especial, a Pablo y Alicia por su amabilidad y simpatía conmigo, a Patricia por su sentido del humor, a Elisa por su benevolencia y a Virginia por su candidez y su ayuda cuando la necesitaba. También a Ana Camacho por su apoyo y a Laura Pérez por su grata compañía.

Quería expresar mi agradecimiento también a algunas personas que no son del grupo de $\phi 29$ y que han tenido un papel en el desarrollo de esta tesis:

A Miguel Ángel Fuertes y Mar Rodríguez, por su ayuda en los experimentos de difracción circular.

También a Alejandro González (Jano) y a la profesora Carmen Ruiz-Rivas, por ayudarme con el análisis estadístico.

A Lucía Gallo (Luci), por su ayuda con la maquetación de la tesis.

Por otra parte, quería agradecer a ciertas personas que, aunque no han estado presentes mientras se hacían los experimentos y tampoco se les suele ver por los laboratorios de biología molecular, sí han hecho posible que esta tesis sea realizada.

Me refiero a mis padres, Asun y Saturio, que me han apoyado siempre, me han animado en todo momento a hacer lo que más me gustaba y han supuesto una ayuda cuando la necesitaba. Nunca podré agradecerlos lo suficiente todo lo que hacéis y habéis hecho por mí.

A mis abuelos Isabel y José Joaquín, por todo lo que me enseñaron y por todo lo que me quisieron.

A Javi, por su generosidad hacia mí. Es una alegría inmensa tener amigos como tú.

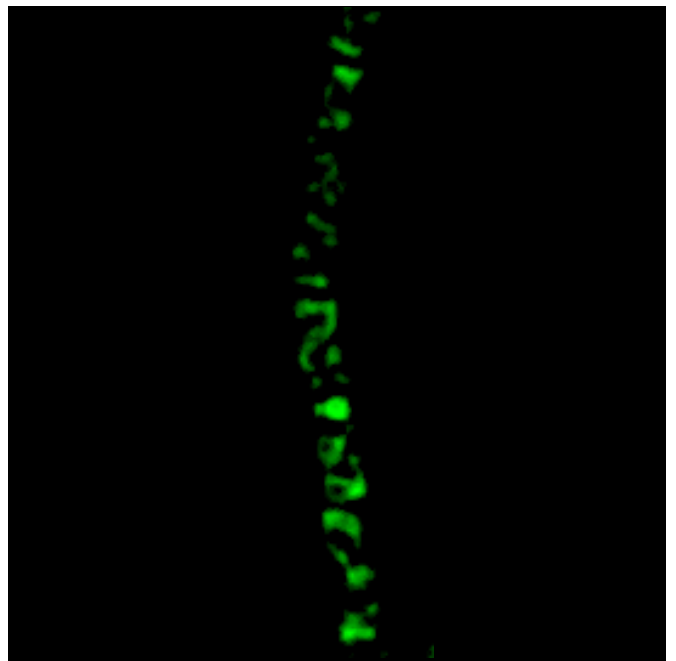
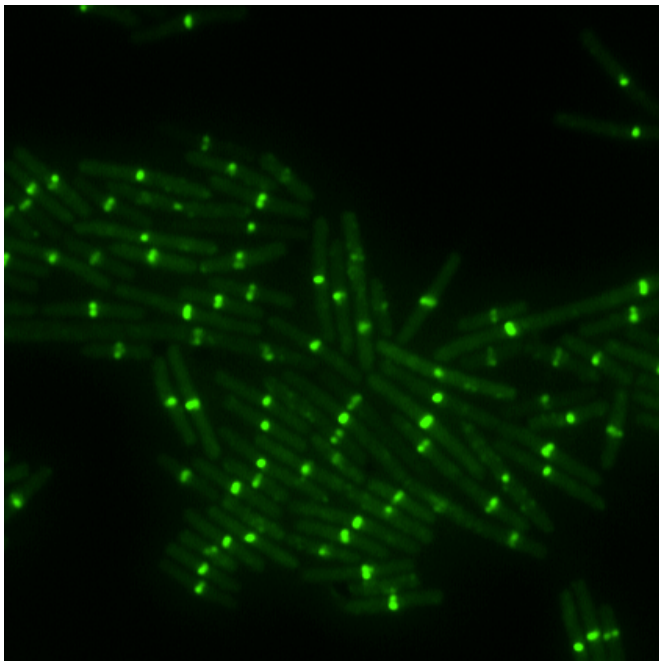
A Pepi y a Ramón, por toda la ayuda desinteresada que me han ofrecido este último año y el cariño y la confianza que me transmiten desde siempre.

A Cris y a Juan, por ayudarme en el tramo final y por ser como mis hermanos.

Y, por supuesto, a Ana, por la felicidad que me transmite y porque sin su esfuerzo constante, su amor y su paciencia no habría sido capaz de terminar esta tesis. A ti te debo muchas cosas, contigo estoy en deuda.

Estudio funcional de las proteínas p1 y p17 del bacteriófago ϕ 29

Tesis Doctoral
David Ballesteros Plaza
Madrid, 2014

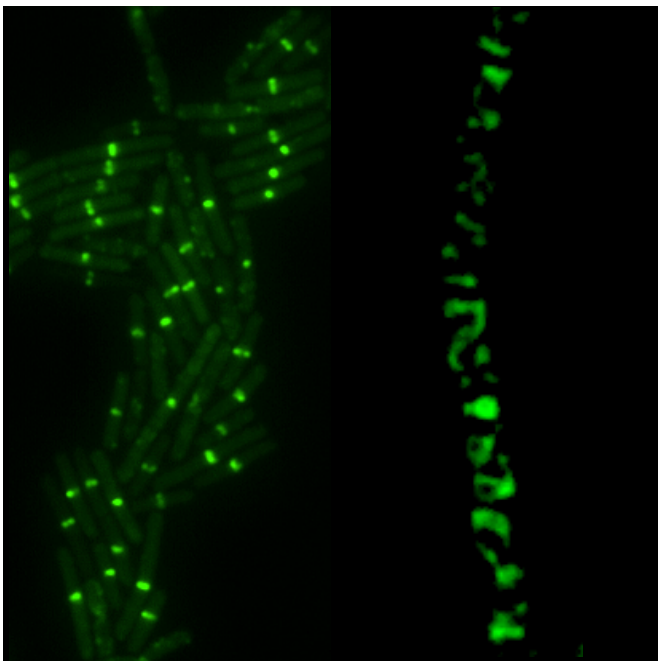


ABREVIATURAS	1
SUMMARY	5
INTRODUCCIÓN	9
1- Replicación del DNA y división celular en <i>Bacillus subtilis</i>	12
1.1- Replicación del DNA en <i>B. subtilis</i>	12
1.1.1- Iniciación de la replicación en <i>B. subtilis</i>	12
1.1.2- Localización de la maquinaria replicativa en <i>B. subtilis</i>	14
1.1.3- Terminación de la replicación en <i>B. subtilis</i>	16
1.2-División celular en <i>B. subtilis</i>	17
2- El bacteriófago $\phi 29$: organización genética y transcripcional, y replicación del DNA	21
2.1- Organización genética y transcripcional del DNA de $\phi 29$	22
2.2- Replicación <i>in vitro</i> del DNA de $\phi 29$	24
2.3- Replicación <i>in vivo</i> del DNA de $\phi 29$	26
3- La proteína p1 del fago $\phi 29$	28
4- La proteína p17 del fago $\phi 29$	30
OBJETIVOS	33
MATERIALES Y MÉTODOS	37
Estirpes bacterianas, fagos y condiciones de crecimiento	39
Construcción de plásmidos	40
Experimentos de microscopía de fluorescencia	42
Ensayo de <i>pull-down</i>	44
Entrecruzamiento químico <i>in vitro</i>	45
Medida de la longitud celular de <i>B. subtilis</i>	46
Cuantificación de la síntesis de DNA viral	46
Fraccionamiento celular	48
Sistema de doble híbrido en bacteria	48
Solubilización con Triton X-114 <i>in vivo</i>	49
Solubilización con Triton X-114 <i>in vitro</i>	50

Dicroísmo circular	50
Cuantificación de la producción de fago	51
RESULTADOS	53
Capítulo I	
Papel de la región C-terminal de la proteína p1 del bacteriófago ϕ29 en su asociación con la membrana bacteriana	55
Las proteínas p1 Δ C2 y p1 Δ C5 se asocian a la membrana bacteriana	57
Las proteínas p1 Δ C2 y p1 Δ C5 complementan en <i>trans</i> la replicación del fago mutante ϕ 29 <i>susI</i> (629).....	59
La proteína p1 Δ C11 no se asocia a la membrana bacteriana	60
La proteína p1 Δ C11 no tiene naturaleza anfifílica <i>in vitro</i>	62
La proteína p1 Δ C11 no tiene naturaleza anfifílica <i>in vivo</i>	63
La proteína p1 Δ C11 tiene una estructura secundaria con un porcentaje alto de desorden	64
Capítulo II	
La proteína p1 del fago ϕ29 promueve la replicación del DNA viral mediante su asociación con el anillo de FtsZ del divisoma de <i>B. subtilis</i>	67
La proteína p1 del bacteriófago ϕ 29 localiza en la parte media de la célula de <i>B. subtilis</i> independientemente de otras proteínas codificadas por el fago	69
La proteína p1 del fago ϕ 29 colocaliza con la proteína FtsZ de <i>B. subtilis</i> independientemente de la presencia de otras proteínas codificadas por el fago	72
La localización de YFP-p1 en la mitad de la célula depende de FtsZ.....	74
La localización celular de YFP-p1 no depende de la síntesis de la pared del septo	76
La proteína p1 del fago ϕ 29 y la proteína FtsZ de <i>B. subtilis</i> están asociadas en un complejo <i>in vivo</i>	77
La proteína FtsZ de <i>B. subtilis</i> interacciona con la proteína p1 Δ C11 <i>in vitro</i>	79
La síntesis de proteína p1 en <i>B. subtilis</i> incrementa la longitud celular	80
La síntesis de DNA viral aumenta con la longitud celular en <i>B. subtilis</i>	83
La producción de fago está incrementada en células con mayor longitud	86

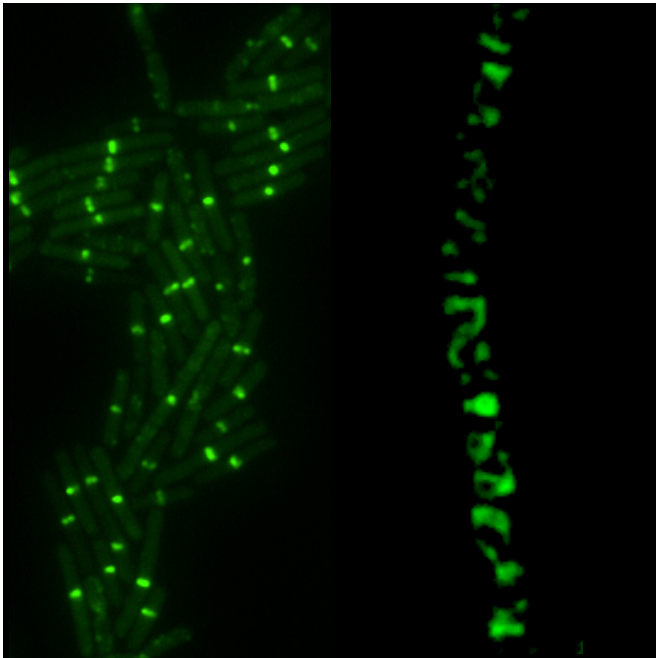
Capítulo III

La proteína p17 del bacteriófago ϕ29: organización subcelular e interacción con otras proteínas	87
La proteína p1 interacciona con la proteína p17	89
La proteína p17 del bacteriófago ϕ 29 localiza formando hélices en células de <i>B. subtilis</i>	90
La proteína p17 colocaliza parcialmente con la proteína p16.7 en <i>B. subtilis</i>	91
La proteína p17 interacciona <i>in vitro</i> con la proteína p16.7	92
La proteína p17 forma hélices en ausencia de p16.7, MreB, Mbl o MreBH	93
La proteína p17 de ϕ 29 localiza formando un patrón helicoidal en ausencia de otros componentes virales en células de <i>B. subtilis</i>	95
DISCUSIÓN.....	97
Papel de la región C-terminal de la proteína p1 en la asociación a la membrana bacteriana	106
Papel biológico de la proteína p17	108
CONCLUSIONES.....	111
BIBLIOGRAFÍA	115
ANEXO	135
Material suplementario	137
Tabla S1. Estirpes utilizadas	139
Tabla S2. Bacteriófagos usados.....	141
Tabla S3. Plásmidos usados	141
Publicaciones	143



Abreviaturas

ATP: adenosina-5'-trifosfato.
 cAMP: adenosina-5'-monofosfato cíclica.
 CFP: proteína fluorescente cian.
 C-terminal: carboxilo terminal.
 Da: Dalton
 DBP: proteína de unión a DNA de cadena doble.
 DC: dicroísmo circular.
 DNA: ácido desoxirribonucleico.
 DO: densidad óptica.
 DSS: disuccinimidil suberato.
 DTT: ditioneitol.
 EDTA: etilén diamino tetracetato.
 FITC: isotiocianato de fluoresceína.
 GFP: proteína fluorescente verde.
 GTP: guanosina-5'-trifosfato.
 HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacín-1-etanosulfónico.
 IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.
 KDa: kilodalton.
 LB: Luria-Bertani.
 M: molar.
 mg: miligramo.
 min: minuto.
 mL: mililitro.
 mM: milimolar.
 MOI: multiplicidad de infección.
 N-terminal: amino terminal.
 PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida.
 pb: par(es) de bases.
 PBS: tampón fosfato salino.
 PCR: reacción en cadena de la polimerasa.
 PFU: unidades formadoras de placa de lisis.
 (p/v): peso/volumen.
 r.p.m.: revoluciones por minuto.
 SDS: dodecil sulfato sódico.
 SSB: proteína de unión a DNA de cadena sencilla.
 TP: proteína terminal.
 Tris: trihidroximetil aminometano.
 (v/v): volumen/volumen.
 wt: tipo silvestre.
 YFP: proteína fluorescente amarilla.
 μ g: microgramo.
 μ M: micromolar.
 μ m: micrómetro.



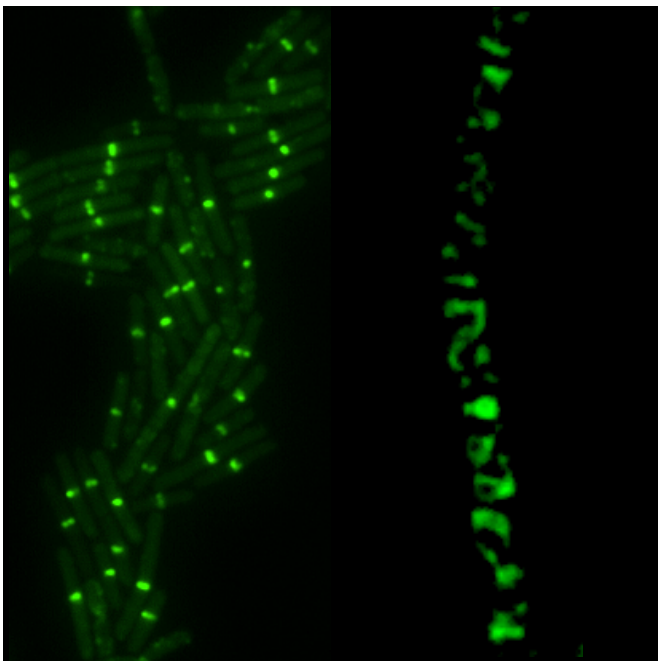
Summary

Bacillus subtilis bacteriophage $\phi 29$ is a well-studied virus used as a model organism to expand knowledge in aspects concerning to DNA replication and transcription. However, little is known about the *in vivo* organization of phage $\phi 29$ DNA replication and the proteins involved in this process.

Phage $\phi 29$ proteins p1 and p17 are known to be required for DNA replication *in vivo* but their temporal and spatial organizations in infected cells have not yet been determined. Although the role of p17 in viral DNA replication *in vivo* has been partially elucidated, phage $\phi 29$ protein p1 function remained elusive.

Protein p1 is a membrane-associated protein that forms large protofilament sheets that resemble eukaryotic tubulin and bacterial FtsZ polymers. In the absence of protein p1, phage $\phi 29$ DNA replication is impaired. In this Thesis, it is shown that a functional fusion of protein p1 to YFP localizes at the medial region of *B. subtilis* cells independently of other phage-encoded proteins. Moreover, protein p1 colocalizes with the *B. subtilis* cell division protein FtsZ and these proteins are associated in a complex. Importantly, the midcell localization of YFP-p1 was disrupted in a strain that does not express FtsZ, and the fluorescent signal was distributed all over the cell. Depletion of penicillin-binding protein 2B (PBP2B) in *B. subtilis* cells did not affect the subcellular localization of YFP-p1, indicating that its distribution does not depend on septal wall synthesis. Interestingly, when $\phi 29$ protein p1 was expressed, *B. subtilis* cells were about 1.5-fold longer than wild type cells, and the accumulation of $\phi 29$ DNA was higher in mutant *B. subtilis* cells with increased length. We propose that protein p1 promotes viral DNA replication by increasing the length of *B. subtilis* cells.

By using a bacterial two hybrids system, we have shown that protein p1 associates with protein p17 *in vivo*. Apart from its role in DNA replication, protein p17 is required for the entrance of viral DNA into the cell during the injection process. In this Thesis, it has been observed that p17 localizes in a helical pattern along the whole *B. subtilis* cell in the absence of other viral components. Also, this localization does not require the cytoskeletal proteins MreB, Mbl or MreBH. The helix-like localization of p17 and its association with the viral protein p16.7, which also distributes in a helical manner, might reflect another role for protein p17, stabilizing p16.7 to redistribute viral genomes at the final stages of $\phi 29$ DNA replication.



Introducción

La duplicación del material genético o replicación de los ácidos nucleicos es un proceso fundamental para la existencia de la vida y la perpetuación de los seres vivos. Debido a su importancia, se ha estudiado durante décadas el mecanismo natural de generación de copias de material genético, ya sea en organismos eucariotas o procariotas, y algunos de estos organismos en los que se ha investigado se han establecido, con el tiempo, como organismos modelo para dichos estudios. Dos de los organismos modelo procarióticos mejor conocidos a nivel de la replicación del DNA y otros aspectos de su ciclo vital son el bacteriófago $\phi 29$ y su hospedador natural, la bacteria *Bacillus subtilis*, los cuales son objeto de estudio en esta tesis.

B. subtilis es una bacteria Gram-positiva que se puede encontrar en su forma vegetativa asociada a materia orgánica en descomposición en el suelo (Siala, 1974), puede crecer en superficies radiculares de plantas (Bais *et al.*, 2004; Rudrappa *et al.*, 2007), que se puede hallar también en ambientes acuáticos (El-Helow, 2001; Miranda *et al.*, 2008) y en el tracto gastrointestinal de animales (Hong *et al.*, 2005; Leser *et al.*, 2008; Tam *et al.*, 2006). A pesar de que *B. subtilis* ha sido generalmente clasificado como aeróbico, puede crecer y esporular lentamente bajo condiciones estrictamente anaeróbicas (Priest, 1993). *B. subtilis* también se puede encontrar en preparados de comida fermentada, como por ejemplo la soja fermentada con *B. subtilis natto* (Inatsu *et al.*, 2006).

Según las condiciones ambientales, *B. subtilis* puede crecer de forma exponencial o bien, cuando los nutrientes son escasos, cambiar la expresión de su programa genético y desarrollar formas móviles, entrar en competencia o activar la vía de esporulación para permanecer quiescente en forma de spora hasta que las condiciones ambientales vuelvan a ser favorables para el crecimiento. Todo ello, unido a la facilidad de su crecimiento en el laboratorio, hace de esta bacteria un buen modelo para estudiar los procesos de replicación del DNA, la diferenciación celular, la competencia o la formación de estructuras de locomoción. Además, *B. subtilis* es capaz de formar superficies de células embebidas en la matriz extracelular que producen (*biofilms*) (Vlamakis *et al.*, 2013) y puede presentar el fenómeno de “biestabilidad” (Dubnau and Losick, 2006; Maamar and Dubnau, 2005), según el cual dos subpoblaciones diferentes coexisten dependiendo del programa genético activo en cada una de ellas, lo que supone una ventaja de supervivencia frente a cambios en las condiciones ambientales.

1- Replicación del DNA y división celular en *Bacillus subtilis*

1.1- Replicación del DNA en *B. subtilis*

B. subtilis tiene un genoma de 4,2 mega pares de bases organizado en un cromosoma circular de DNA de doble cadena, que contiene unos 4100 genes (Kunst *et al.*, 1997). La replicación de este cromosoma comienza en un sitio único, denominado *OriC*, y tiene lugar bidireccionalmente, de tal forma que una horquilla de replicación se desplaza en el sentido de las agujas del reloj y la otra horquilla en sentido contrario, hasta que se alcanza la zona opuesta del cromosoma, que contiene las secuencias cortas de DNA que promueven la detención de la replicación (los sitios *Ter*, ver más adelante).

1.1.1- Iniciación de la replicación en *B. subtilis*

El inicio del proceso replicativo se produce cuando la proteína iniciadora DnaA (presente en todos los genomas de Eubacterias analizados (Robinson *et al.*, 2012; Skarstad and Boye, 1994)) se une a secuencias específicas del *OriC* (cajas *dnaA*), que inducen una unión cooperativa de moléculas de DnaA a sitios cercanos ricos en bases A-T, promoviendo la apertura de la doble hebra de DNA (Fukuoka *et al.*, 1990; Krause *et al.*, 1997). Las proteínas DnaB, DnaD y DnaI inducen la unión de la helicasa DnaC a la cadena sencilla de DNA en el *OriC* (Smits *et al.*, 2010; Velten *et al.*, 2003). En particular, DnaB está implicada en la unión de DnaA con la membrana celular y también juega un papel compactando lateralmente el DNA (Zhang *et al.*, 2005). A su vez, DnaD produce una curvatura en el DNA, elimina la torsión y abre la doble hélice (Turner *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008). La primasa DnaG se asocia con la helicasa replicativa DnaC para formar, junto con las proteínas anteriormente mencionadas, el primosoma, que abrirá la doble cadena de DNA y sintetizará los cebadores de RNA a lo largo de la cadena sencilla de DNA. Para mantener la doble cadena abierta y que la cadena sencilla no adopte estructura secundaria o se vuelva a unir a la hebra complementaria, *B. subtilis*, al igual que otros organismos, utiliza una proteína de unión a banda sencilla (SSB). En el caso de *B. subtilis*, se conocen dos proteínas SSB, la proteína denominada SSB y la denominada YwpH (SsbB), siendo la primera esencial para la supervivencia celular (Kobayashi *et al.*, 2003). La transcripción del gen que codifica SSB es alta en células que crecen

rápidamente, mientras que la del gen que codifica SsbB está fuertemente inducida durante el desarrollo de la competencia y se requiere para una competencia óptima (Berka *et al.*, 2002; Hahn *et al.*, 2005; Lindner *et al.*, 2004). SSB tiene un papel central en el reclutamiento de proteínas a la horquilla de replicación. Se ha descrito que el extremo C-terminal de SSB mantiene una red de interacciones que incluyen a 12 proteínas que localizan en la horquilla de replicación (Costes *et al.*, 2010).

Una vez formado el primosoma y sintetizado el cebador de RNA, las DNA polimerasas sintetizarán la nueva cadena de ácido nucleico. En *B. subtilis* existen dos polimerasas esenciales para la replicación del DNA, la DNA polimerasa III (codificada por el gen *polC*) y la DNA polimerasa DnaE (Dervyn *et al.*, 2001; Gass and Cozzarelli, 1973). La DNA polimerasa III o PolC contiene el sitio activo de polimerización en el extremo C-terminal, y el centro activo corrector de errores con actividad exonucleasa se sitúa en el dominio N-terminal (Barnes *et al.*, 1992; Sanjanwala and Ganesan, 1989, 1991), mientras que DnaE no tiene asociada actividad exonucleasa y puede sintetizar DNA *in vitro* en muchos tipos de lesiones de DNA que generalmente bloquean otras polimerasas replicativas (Bruck *et al.*, 2003; Le Chatelier *et al.*, 2004). Ambas polimerasas llevan a cabo la replicación del DNA en *B. subtilis* de forma complementaria y se ha propuesto que PolC y DnaE tienen diferentes papeles en la síntesis de la cadena líder y la cadena retrasada (Dervyn *et al.*, 2001). De hecho, se ha descrito que DnaE sintetiza primero el DNA a partir de los cebadores de RNA en la hebra retrasada y PolC continúa posteriormente la elongación (Sanders *et al.*, 2010). Además de estas dos polimerasas, la DNA polimerasa I retira los segmentos de RNA y sintetiza el DNA de los fragmentos de Okazaki (Tamanoi *et al.*, 1977), que serán unidos por la DNA ligasa.

La replicación del cromosoma bacteriano está finamente regulada para asegurar que el inicio de la replicación ocurra sólo una vez por ciclo celular (Boye *et al.*, 2000). En particular, en *B. subtilis*, Spo0J y Soj son componentes del sistema ParA-ParB-*parS* (Ogasawara and Yoshikawa, 1992), implicado en la segregación del DNA genómico de *B. subtilis*, y juegan un papel también en la iniciación de la replicación del DNA. Se sabe que la inactivación de Soj (ParA) o de Soj y Spo0J provoca iniciaciones de la replicación por encima del nivel normal (Lee and Grossman, 2006). Soj interacciona con DnaA e inhibe la iniciación de la replicación (Murray and Errington, 2008), ya que regula el ensamblaje del complejo helicoidal de DnaA sobre el origen de replicación (Scholefield *et al.*, 2012). La proteína Spo0J inhibe la dimerización de Soj mediante la

estimulación de su actividad ATPasa (Scholefield *et al.*, 2011) y de esta manera controla la función de Soj sobre DnaA, regulando así la iniciación de la replicación del cromosoma bacteriano. Además, se ha observado que la unión de Spo0J sobre la región *parS*, que se encuentra posicionada cerca del *OriC*, causa la interacción de las proteínas SMC (mantenimiento estructural del cromosoma) (Sullivan *et al.*, 2009) sobre esta zona del DNA.

Por otro lado, la proteína YabA se une a DnaA y a DnaN para formar un complejo ternario que regula la iniciación de la replicación, posiblemente secuestrando DnaA y evitando su proximidad a los orígenes de replicación justo después de la iniciación, impidiendo así posibles reiniciaciones (Noirot-Gros *et al.*, 2006; Soufo *et al.*, 2008). Se sabe que YabA se asocia *in vivo* con la región del *OriC* de forma dependiente de DnaA y limita la cantidad de DnaA en el *OriC* (Merrikh and Grossman, 2011).

1.1.2- Localización de la maquinaria replicativa en *B. subtilis*

La fusión de la polimerasa PolC de *B. subtilis* con la proteína verde fluorescente (GFP) sirvió para observar la localización intracelular de dicha polimerasa. Por medio de esta aproximación experimental Lemon y Grossman (Lemon and Grossman, 1998) demostraron que durante el crecimiento exponencial de *B. subtilis*, la DNA polimerasa localizaba en posiciones intracelulares discretas, predominantemente en la mitad celular o en sus alrededores, en lugar de estar distribuida por todo el nucleoide (ver Fig. 1 ii-v). Además comprobaron que los componentes δ' y τ de la polimerasa III holoenzima fusionados a GFP localizaban de manera similar a como lo hacía la fusión PolC-GFP. Por otra parte, se ha observado que el replisoma localiza en el centro de la célula de manera estacionaria, y ese lugar constituye el sitio de síntesis del DNA (Lemon and Grossman, 2000), lo que indica que es el DNA el que se mueve durante la replicación, mientras que la DNA polimerasa se mantiene fija en el centro celular (Fig. 1 ii-v). Mediante técnicas de inmunofluorescencia se detectaron las proteínas DnaB y DnaI como focos localizados cerca del límite del nucleoide o bien en la región del *OriC* durante la iniciación de la replicación (Imai *et al.*, 2000). Además, mediante el uso de secuencias de unión de la proteína LacI insertadas en las regiones *OriC* y *Ter* y la expresión de la proteína de fusión GFP-LacI, se pudo observar que las regiones *OriC* se encuentran en los polos celulares de manera temprana en el ciclo celular (Fig. 1, iii-v),

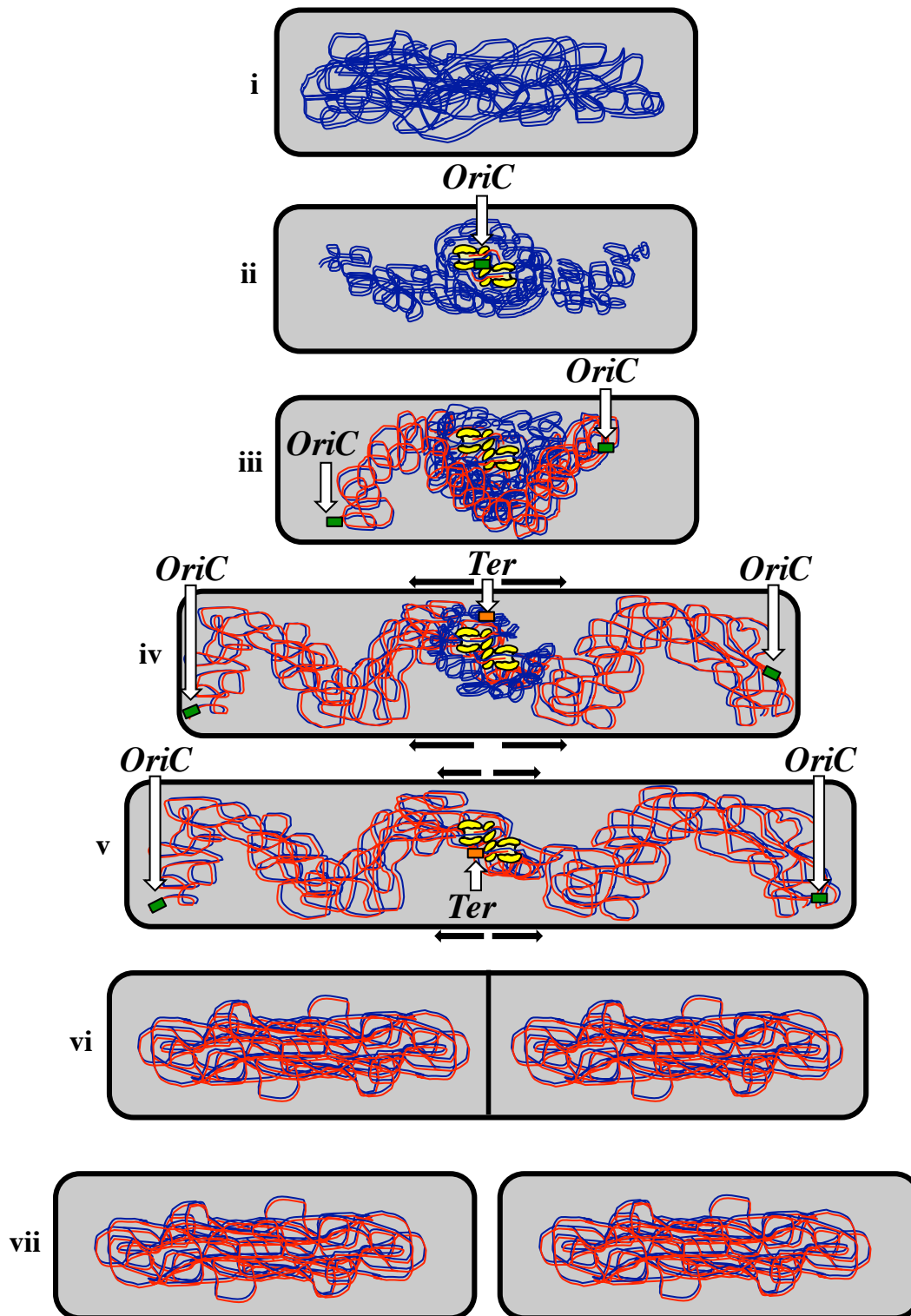


Fig. 1. Replicación del DNA genómico en *B. subtilis*. La bacteria (i) sintetiza las DNA polimerasas (representadas en amarillo) (ii), que localizan en el nucleoide (hebras azules) y comienzan a replicar el DNA a partir de la región del *OriC* (rectángulo verde), situada en el centro de la célula (ii). El nuevo DNA recién sintetizado (hebra roja) se segrega hacia los polos de la bacteria, siguiendo un patrón helicoidal (iii), mientras que las DNA polimerasas, que forman parte del replisoma, se mantienen fijas en zonas centrales de la célula. La región de terminación de la replicación (rectángulo naranja) se acerca a zonas centrales, mientras el DNA recién sintetizado se sigue segregando helicoidalmente hacia los polos celulares y la bacteria crece longitudinalmente (iv y v). Cuando el DNA ha terminado de replicarse, se forma un septo en mitad de la célula madre (vi). Finalmente, la célula se divide en dos para generar dos células hijas (vii).

mientras que las regiones *Ter* fueron observadas hacia la mitad celular (Webb *et al.*, 1997) (Fig. 1, *iv* y *v*). En un estudio por *time-lapse* se determinó que las regiones recién replicadas del *OriC* se separan y se mueven rápidamente hacia los polos celulares desde la región central de la célula (Webb *et al.*, 1998). Resultados complementarios fueron obtenidos por Berlatzky *et al.* (2008). Estos autores observaron que el DNA cromosómico recién replicado era translocado siguiendo un patrón helicoidal desde la mitad de la célula hasta los polos, donde se acumulaba (ver Fig. 1, *iii-v*).

1.1.3- Terminación de la replicación en *B. subtilis*

Clásicamente, la terminación de la replicación del DNA genómico en *B. subtilis* ocurre cuando las horquillas de replicación alcanzan la región cromosómica que contiene los sitios *Ter*, que están ubicados en la región opuesta al *OriC*. A estos sitios se une la proteína RTP (*replication termination protein*, de 122 aminoácidos) (Lewis *et al.*, 1989) y, de esta forma, el complejo nucleoproteico RTP-*Ter* bloquea las horquillas de replicación, produciéndose la terminación. Los sitios *Ter* son secuencias de 30 pb compuestas por dos hemisecuencias de 16 pb que se solapan en un trinucleótido altamente conservado (Lewis *et al.*, 1990). La proteína RTP forma un dímero que se asocia a una mitad del sitio *Ter* con alta afinidad. A la hemisecuencia restante se une otro dímero cuando ya se ha unido el anterior. La interacción de RTP con los sitios *Ter* causa una curvatura de 30 grados en el DNA (Kralicek *et al.*, 1997), impidiendo la replicación en un sentido, pero permitiendo la replicación en el sentido opuesto (Griffiths *et al.*, 1998). Solamente cuando los dos sitios de la secuencia *Ter* están ocupados por la proteína RTP, se produce el bloqueo de la horquilla de replicación (Duggin *et al.*, 1999). De esta manera, el mecanismo que lleva al bloqueo de la horquilla de replicación por el complejo RTP-*Ter* se basa en la unión cooperativa entre dos dímeros RTP que se unen a un sitio de alta y a otro de baja afinidad dentro de la secuencia *Ter*. Se sabe que la unión de RTP es cooperativa ya que el dímero no se une al sitio de menor afinidad hasta que no se haya unido anteriormente un dímero al sitio de alta afinidad. Además, la unión de RTP solamente al sitio de mayor afinidad es incapaz de detener la helicasa replicativa. RTP se une al DNA por medio de un motivo *winged-helix* (Gajiwala and Burley, 2000) y se cree que estos motivos facilitan la cooperatividad de la unión (Manna *et al.*, 1996; Wilce *et al.*, 2001). El bloqueo de la replicación sólo ocurre cuando la helicasa replicativa se aproxima al dímero RTP por el

lado donde se encuentra el sitio de mayor afinidad. Pero cuando la helicasa replicativa se acerca al sitio de baja afinidad, es capaz de desplazar a la RTP unida y pasar por el complejo terminador (Smith and Wake, 1992).

En los últimos años se ha postulado la hipótesis de los terminadores *dif* (Hendrickson and Lawrence, 2007) para explicar la terminación de la replicación. Esta hipótesis alternativa sugiere que el bloqueo de la horquilla de replicación ocurre en los sitios *dif* o en sus proximidades, tanto en *B. subtilis* como en *Escherichia coli*, y no estaría controlado por los sitios *Ter*. Los sitios *dif* son secuencias de 28 pb muy conservadas en bacteria (Carnoy and Roten, 2009; Kono *et al.*, 2011; Val *et al.*, 2008) y que se localizan cerca de la región clásica de terminación de la replicación (Blakely *et al.*, 1993; Clerget, 1991), en la que tiene lugar la recombinación específica de sitio (Duggin *et al.*, 2008).

1.2- División celular en *B. subtilis*

Para generar dos células hijas, además de producirse la replicación del DNA, la célula progenitora tiene que crecer y finalmente dividirse en dos. En *B. subtilis*, en el proceso de división celular o citocinesis se organizará inicialmente, en mitad de la célula, un anillo formado por alrededor de una docena de proteínas distintas (el divisoma) y finalmente se constituirá un septo que separará las dos células hijas (extensamente revisado en Adams and Errington, 2009; Erickson *et al.*, 2010; Harry *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2013; Lutkenhaus *et al.*, 2012). Para iniciar el proceso de división celular bacteriana la proteína FtsZ se ensambla en una estructura anular asociada a la membrana plasmática de la bacteria y forma lo que se ha denominado el anillo Z. FtsZ es una proteína presente en casi todas las bacterias, a excepción de las bacterias de la familia Chlamydiaceae (Vaughan *et al.*, 2004), que son de vida intracelular obligada, y de las bacterias de vida libre *Ureaplasma urealyticum* (Glass *et al.*, 2000) y *Pirellula* sp. strain 1 (Glockner *et al.*, 2003). FtsZ también está presente en muchas Arqueas (Vaughan *et al.*, 2004), así como en cloroplastos de plantas y en mitocondrias de algunos eucariotas inferiores (Kiefel *et al.*, 2004; Osteryoung and Nunnari, 2003). A pesar de tener muy poca homología de secuencia con la tubulina eucariótica (<20% de identidad de secuencia (Erickson, 1995; Weiss, 2004)), que forma los microtúbulos, FtsZ muestra una estructura tridimensional muy parecida a la de las subunidades de tubulina, por lo que se considera su homólogo ancestral (Nogales *et al.*,

1998), y también une y es capaz de hidrolizar GTP (de Boer *et al.*, 1992; Mukherjee *et al.*, 1993; RayChaudhuri and Park, 1992). En presencia de GTP, FtsZ se ensambla reversiblemente en protofilamentos *in vitro* que, al microscopio electrónico, se parecen a los protofilamentos que forman los microtúbulos (Erickson and Stoffler, 1996; Erickson *et al.*, 1996). FtsZ, a diferencia de la tubulina, no tiene isoformas y se une monómero con monómero en lugar de realizar uniones entre heterodímeros, y por tanto la unidad básica de ensamblaje es un filamento de una sola subunidad de grosor (Chen *et al.*, 2005; Mukherjee and Lutkenhaus, 1994). FtsZ y tubulina difieren en sus superficies laterales para interaccionar entre protofilamentos y ensamblar en estructuras de niveles superiores (Nogales *et al.*, 1998) y, de hecho, FtsZ forma megaestructuras distintas a los microtúbulos *in vivo*. La autoasociación de FtsZ es necesaria para que las demás proteínas implicadas en la formación del divisoma se asocien y pueda tener lugar la división celular. Se ha descrito que todas las proteínas del divisoma conocidas dependen de FtsZ para su localización en el sitio de división y que la localización de FtsZ en el sitio de división es independiente de cualquiera de las otras proteínas del divisoma (Addinall *et al.*, 1996; Errington *et al.*, 2003).

Se conocen alrededor de 24 proteínas asociadas a división celular en *B. subtilis* y se pueden dividir en tres grupos:

(a) las proteínas que constituyen el divisoma y que están directamente involucradas en la construcción del septo: DivIB, DivIC, EzrA, FtsA, FtsL, FtsW, FtsZ, GpsB/YpsB, PBP1, PBP2B, SepF y ZapA.

(b) las proteínas que regulan el ensamblaje del divisoma: ClpX, DivIVA, MciZ, MinC, MinD, MinJ, Noc, UgtP e YneA.

(c) las proteínas cuya función es coordinar la formación del septo con la segregación cromosómica: SpoIIIE y SftA. Por último, SpoIIIE es una proteína transmembrana requerida para la formación del septo que se produce en uno de los polos cuando la bacteria esporula (Gueiros-Filho, 2012).

Dentro de las proteínas que forman el divisoma, se ha descrito que la unión de éstas ocurre en dos etapas separadas temporalmente en *B. subtilis* (Gamba *et al.*, 2009) (ver Fig. 2). Las proteínas que se unen de forma temprana son: FtsZ, FtsA, ZapA y SepF. FtsZ es esencial para que se forme el anillo Z y sus características más relevantes se han descrito brevemente con anterioridad. FtsA es la segunda proteína de división celular bacteriana más conservada, después de FtsZ, y pertenece a la superfamilia de proteínas de unión a ATP, que incluye actina, MreB, Hsp70 y hexoquinasa. La

determinación de la estructura cristalina de la FtsA de *Thermotoga maritima* reveló que es muy similar a actina (van den Ent and Lowe, 2000) y estudios bioquímicos mostraron que es capaz de hidrolizar ATP (Feucht *et al.*, 2001). FtsA es la principal proteína que facilita la interacción de FtsZ con la membrana (Pichoff and Lutkenhaus, 2005) y parece que FtsA es capaz de interaccionar con FtsZ antes del inicio de la formación del anillo Z y, por tanto, es requerida para un ensamblaje eficiente de dicho anillo (Jensen *et al.*, 2005).

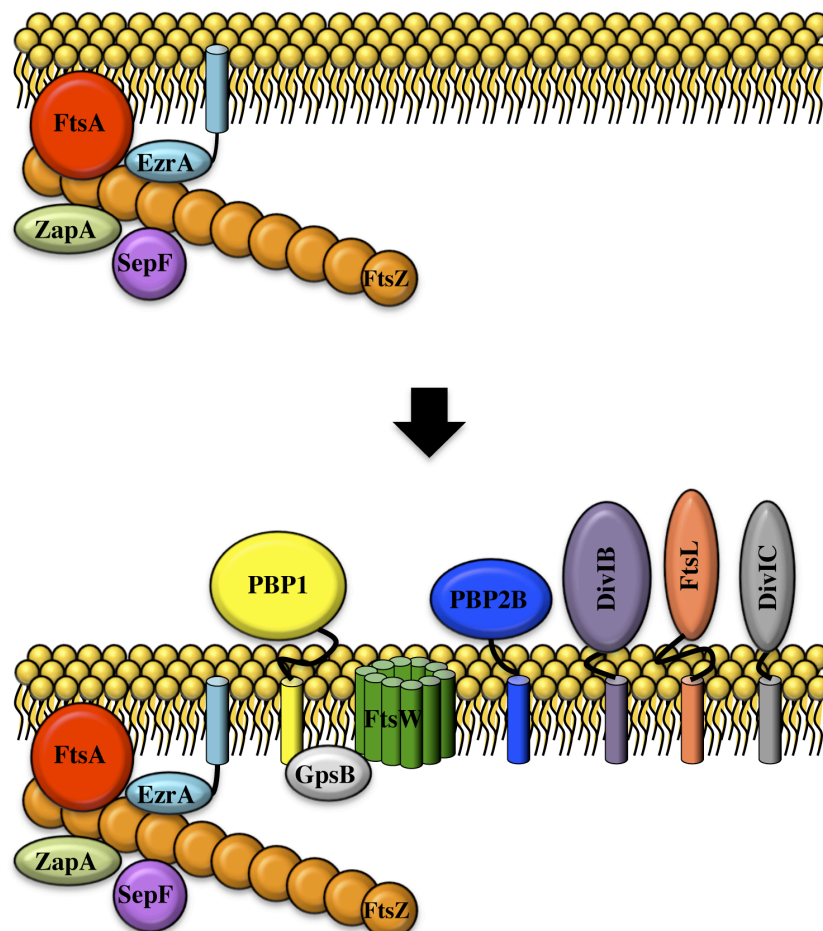


Fig. 2. El ensamblaje del divisoma ocurre en dos etapas en *B. subtilis*. En la primera etapa FtsZ interacciona con FtsA para asociarse a la membrana, ZapA promueve la formación de uniones entre monómeros de FtsZ, SepF se asocia con FtsZ y EzrA impide la formación de anillos Z extra. En la segunda etapa, las demás proteínas formadoras del divisoma se unen para ensamblar el divisoma completo y sintetizar finalmente el septo que separará las células hijas.

La proteína SepF también juega un papel en el ensamblaje del anillo Z. De hecho, esta proteína interacciona con FtsZ y promueve el ensamblaje de polímeros de FtsZ (Gundogdu *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2008). EzrA, por su parte, es un inhibidor de la formación de anillos Z, ya que la delección del gen que codifica esta proteína en *B. subtilis* provoca la formación extra de anillos Z incluso cuando los niveles de FtsZ son

bajos (Levin *et al.*, 1999). Además, la síntesis de EzrA en niveles superiores a lo normal, puede inhibir el anillo Z (Haeusser *et al.*, 2004). Finalmente, ZapA es capaz de promover el ensamblaje de FtsZ para formar el anillo Z (Gueiros-Filho and Losick, 2002).

En *B. subtilis* se conocen siete proteínas que son reclutadas al divisoma de manera tardía durante su ensamblaje y ninguna de ellas parece unirse directamente a FtsZ. DivIB, DivIC y FtsL interaccionan formando un complejo ternario que uniría PBP2B para localizar la maquinaria de síntesis del peptidoglicano en el sitio de división (Gueiros-Filho, 2012). De esta manera, la proteína PBP2B podría llevar a cabo su actividad transpeptidasa para la síntesis de la pared del septo en el sitio de división. Se sabe que las células de *B. subtilis* que no sintetizan PBP2B tienen bloqueada la formación del septo, pero no tienen afectada la elongación celular (Daniel *et al.*, 2000; Yanouri *et al.*, 1993). Otra proteína que está implicada en la formación de la pared celular en el divisoma es la proteína PBP1, una enzima bifuncional que tiene actividad transglicosilasa y transpeptidasa y que es codificada por el gen *ponA* (Yanouri *et al.*, 1993). FtsW tiene varios dominios transmembrana y se ha propuesto como un transportador de precursores de peptidoglicano (Mohammadi *et al.*, 2011).

En *B. subtilis* existen dos sistemas para asegurar una correcta división, que ajustan la segregación cromosómica y la citocinesis para que la división ocurra sólo en el sitio correcto: el sistema Min y el sistema de oclusión del nucleóide (NO) (revisados en Bramkamp and van Baarle, 2009; Wu and Errington, 2012).

El sistema Min se compone de las proteínas MinC, MinD, MinJ y DivIVA y entre todas ellas aseguran que la división celular ocurra en la región central de la bacteria, impidiendo que se divida en regiones polares, que producirían mini células. El sistema Min previene el ensamblaje del anillo Z cerca de los polos por medio de la regulación espacial del antagonista de FtsZ, MinC, que interacciona con MinD formando un complejo capaz de inhibir la formación del anillo Z en el sitio específico donde se encuentran (Lutkenhaus, 2007). MinC se une a dos regiones de FtsZ (Blasios *et al.*, 2013) para inhibir la división, mientras que MinD localiza y concentra MinC en la membrana citoplasmática (Marston and Errington, 1999). La proteína DivIVA localiza preferentemente en membranas con curvatura negativa generadas por el inicio de la citocinesis (Eswaramoorthy *et al.*, 2011) y concentra el complejo MinCD en los polos, disminuyendo la presencia de este complejo en la región central de la célula. Por último, MinJ es una proteína integral de membrana con un dominio que une DivIVA y

MinD y sirve de puente entre estas dos proteínas (Bramkamp *et al.*, 2008; Patrick and Kearns, 2008).

Por otra parte, el sistema de oclusión del nucleoide controla que la división celular no ocurra en el lugar donde se encuentra el DNA cromosómico, impidiendo de esta manera que el cromosoma bacteriano sea fragmentado por la formación del septo y la división celular. El primer efector descubierto fue Noc (Wu and Errington, 2004). Bajo diversas condiciones en las que el ciclo celular fue perturbado, se determinó que Noc impedía el ensamblaje de la maquinaria de división en los alrededores del nucleoide, y que la delección del gen *noc* permitía que el septo se formase sobre nucleoides todavía no segregados (Wu and Errington, 2004). Experimentos de precipitación de cromatina han mostrado que Noc se une a unas 70 repeticiones invertidas de 14 pb repartidas por el DNA cromosómico de *B. subtilis*, pero ausentes en la región *Ter* y zonas aledañas (Wu *et al.*, 2009). Por tanto, sólo cuando en la región central de la célula se encuentra la región *Ter* (*i. e.* cuando está terminando la replicación del cromosoma), la proteína Noc pierde su capacidad de inhibir la división celular, pues no se encuentra unida a la región contigua a los sitios *Ter*. Recientemente, en esporas de *B. subtilis* recién germinadas que carecían de los sistemas Min y NO, se ha observado que, aunque retrasada, la división todavía ocurría principalmente en la mitad celular (Rodrigues and Harry, 2012), por lo que parece existir algún factor adicional, todavía no identificado, que ayuda a posicionar el anillo Z en mitad de la célula.

2- El bacteriófago ϕ 29: organización genética y transcripcional y replicación del DNA

El bacteriófago ϕ 29 es un virus icosaédrico perteneciente a la familia *Podoviridae* (fagos con cola corta y gruesa), dentro del orden *Caudovirales* (fagos con cola) (Ackermann, 1998) e infecta la bacteria *B. subtilis* desarrollando, en condiciones de laboratorio, un ciclo lítico en alrededor de 50 min a 37 °C. Su material genético es una doble cadena de DNA lineal de 19.285 pb (Vlcek and Paces, 1986) que contiene unos veinte genes y cada extremo de este DNA tiene unida covalentemente una molécula de proteína terminal (Salas *et al.*, 1978), producto del gen 3 del genoma del fago ϕ 29. Este organismo modelo ha sido estudiado en profundidad en biología

molecular y se conocen muchos detalles de la replicación de su DNA, de su transcripción y de su morfogénesis.

2.1- Organización genética y transcripcional del DNA de $\phi 29$

En el genoma de $\phi 29$ hay tres regiones diferenciadas transcripcionalmente: dos regiones que comprenden los genes de expresión temprana, ubicadas en los extremos, y una región con los genes de expresión tardía, localizada en la región media del genoma. El operón temprano del extremo izquierdo se transcribe desde los promotores *A2b* y *A2c* y el que está localizado en el extremo derecho, desde el promotor *C2*.

El operón temprano del extremo izquierdo contiene los genes *56*, *1*, *2*, *3*, *4*, *5* y *6*. Salvo el gen *4*, los demás genes están implicados en la replicación del DNA de $\phi 29$. Entre ellos, los genes *2*, *3*, *5* y *6* son esenciales para la replicación del DNA de $\phi 29$ *in vivo* (Meijer *et al.*, 2001a; Salas, 1991, 1999). El gen *4*, codifica la proteína p4, que es el regulador transcripcional fundamental para el paso de la transcripción temprana a tardía (Barthelemy *et al.*, 1987). El gen *56* codifica la proteína p56, cuya función es inhibir la uracil-DNA glicosilasa de *B. subtilis*, que elimina el uracilo presente de forma anómala en el DNA viral. Posteriormente, la AP endonucleasa produce cortes en la cadena de DNA. Así, la proteína p56 previene la ruptura de la cadena de DNA de $\phi 29$ en los intermedios de replicación (Serrano-Heras *et al.*, 2008; Serrano-Heras *et al.*, 2007). El gen *1* codifica la proteína p1, que es sujeto de estudio en esta tesis y se describe más adelante. El gen *2* codifica la proteína p2, que es la DNA polimerasa que replica el DNA viral. El gen *3* codifica la proteína p3 o proteína terminal (TP), que actúa como cebador proteico en la iniciación de la replicación del DNA de $\phi 29$ y permanece unida covalentemente a cada extremo 5' del DNA viral. Por su parte, las proteínas p5 y p6 son codificadas por los genes *5* y *6*, respectivamente. La proteína p5 es la proteína de unión a DNA de banda sencilla, mientras que la proteína p6 es la proteína de unión a DNA de cadena doble y tiene un papel clave en la iniciación de la replicación del DNA viral.

El operón temprano del extremo derecho es el primero en ser transcrito, incluso antes de que se complete toda la inyección del genoma del fago dentro de la célula (González-Huici *et al.*, 2006), y contiene los genes que codifican las proteínas p17 y p16.7. Estas dos proteínas están implicadas en la inyección del genoma de $\phi 29$ dentro de la célula durante la infección (Alcorlo *et al.*, 2007; González-Huici *et al.*, 2004b) y

tienen un papel en la replicación del DNA viral (González-Huici *et al.*, 2004a; González-Huici *et al.*, 2006; Meijer *et al.*, 2000; Meijer *et al.*, 2001b; Muñoz-Espín *et al.*, 2009; Serna-Rico *et al.*, 2003; Serna-Rico *et al.*, 2002). La proteína p17 también ha sido objeto de estudio durante esta tesis (ver más adelante). Además de los genes 17 y 16.7, en este operón existen las fases de lectura abierta 16.9, 16.8, 16.6 y 16.5.

El operón que contiene los genes de transcripción tardía codifica las proteínas estructurales del fago, las implicadas en la morfogénesis y en la lisis celular. En concreto, contiene los genes 7 a 16. Entre estos genes, cabe mencionar el gen 14, que codifica la proteína p14 u holina (Steiner *et al.*, 1993). Esta proteína produce la lisis de la bacteria al final del ciclo viral. Cuando es necesario estudiar el fago $\phi 29$ en fases tardías de su ciclo viral, se utiliza el bacteriófago mutante $\phi 29$ *sus14*(1242), que tiene una mutación sin sentido que imposibilita la síntesis de la proteína p14 en células no supresoras de *B. subtilis* y, por tanto, estas células infectadas presentan una lisis tardía.

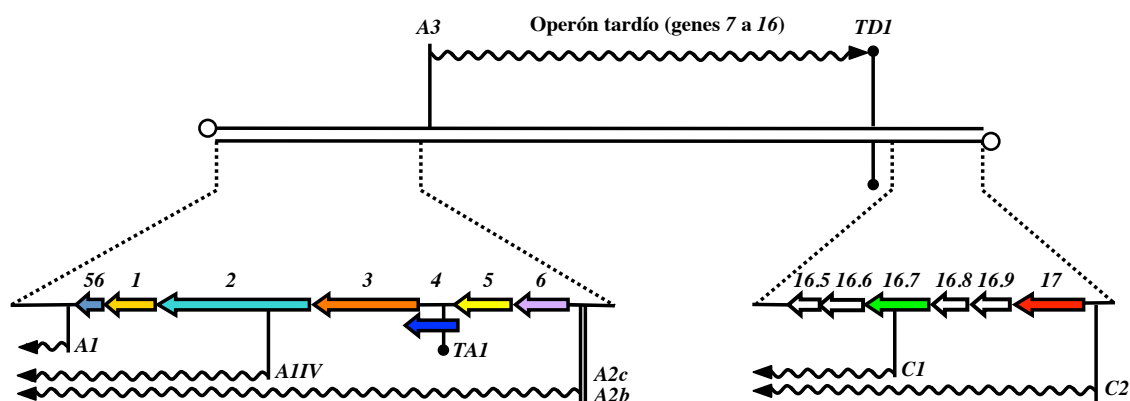


Fig. 3. Organización genética y transcripcional del genoma del bacteriófago $\phi 29$. En color, se han destacado los genes tempranos, todos implicados en la replicación del DNA viral, a excepción del gen 4, que está implicado en la regulación transcripcional. Las flechas blancas en el operón temprano derecho indican fases de lectura abierta. Los nombres de los genes o de las fases de lectura abierta están indicados encima de cada flecha. El operón tardío, situado en la región intermedia del genoma, contiene los genes del 7 al 16. Se indica la posición de los promotores A1, A1IV, A2c, A2b, A3, C1 y C2.

La transcripción de los tres operones del bacteriófago $\phi 29$ está finamente regulada y ha sido ampliamente estudiada (revisado en Camacho and Salas, 2010; Meijer *et al.*, 2001a; Rojo *et al.*, 1998; Salas and Rojo, 1993). Como ya se ha comentado, la proteína p4 es un regulador transcripcional, pero la proteína p6 también está implicada en el control de la transcripción de los genes de $\phi 29$, siendo fundamental en la transición de transcripción temprana a tardía (Calles *et al.*, 2002; Camacho and Salas, 2001, 2004; Elías-Arnanz and Salas, 1999).

2.2- Replicación *in vitro* del DNA de $\phi 29$

La replicación del DNA de $\phi 29$ puede reproducirse *in vitro* solamente con cuatro proteínas purificadas del fago, además del TP-DNA y de los nucleótidos que formarán el DNA de nueva síntesis (Blanco *et al.*, 1994). En particular, las proteínas p2 (DNA polimerasa), p3 (proteína terminal), p5 (proteína de unión a banda sencilla) y p6 (proteína de unión a banda doble) son indispensables para que la reacción tenga lugar (revisado en Salas, 1999). La iniciación de la replicación tiene lugar cuando se produce el reconocimiento de los orígenes de replicación (los extremos unidos covalentemente a las TPs) por el heterodímero DNA polimerasa/proteína terminal (ver Fig. 4). La proteína p6 se une a cada uno de los extremos del genoma de $\phi 29$ formando un complejo nucleoproteico que activa la iniciación de la replicación, probablemente abriendo la doble hélice del DNA (Serrano *et al.*, 1994; Serrano *et al.*, 1990). La DNA polimerasa cataliza la formación de un enlace covalente entre el dAMP y el grupo hidroxilo de la Ser232 de una molécula de proteína terminal (TP) cebadora, utilizando como molde el segundo nucleótido del extremo del genoma. Seguidamente, tiene lugar el proceso de “deslizamiento hacia atrás” (“*sliding-back*”), de tal manera que el complejo TP-dAMP retrocede al primer nucleótido molde del extremo del genoma, para así recuperar toda la información genética (Méndez *et al.*, 1992). A continuación, la DNA polimerasa sintetiza un producto de entre seis y nueve nucleótidos antes de disociarse de la proteína terminal unida al DNA de nueva síntesis (Méndez *et al.*, 1997). La replicación que realiza la DNA polimerasa comienza en ambos extremos del genoma y se produce con alta procesividad, acoplada a desplazamiento de banda (Blanco *et al.*, 1989). En la primera etapa de la replicación, se forma un intermedio replicativo de tipo I por genoma replicado. Este intermedio replicativo es un genoma de doble cadena en toda su extensión, con una ramificación de cadena simple, de longitud variable, en el extremo. Más adelante, el intermedio replicativo de tipo I presentará, además, una ramificación de cadena simple en el otro extremo del genoma. El intermedio de tipo I pasa a ser de tipo II cuando las DNA polimerasas convergen y se separan las dos cadenas molde, de tal manera que se producen dos intermedios con cadenas parcialmente dobles y parcialmente sencillas (Gutiérrez *et al.*, 1991; Inciarte *et al.*, 1980). Durante todo el proceso, los segmentos de DNA de cadena sencilla generados son estabilizados por la proteína p5 y de esta manera se estimula la incorporación de

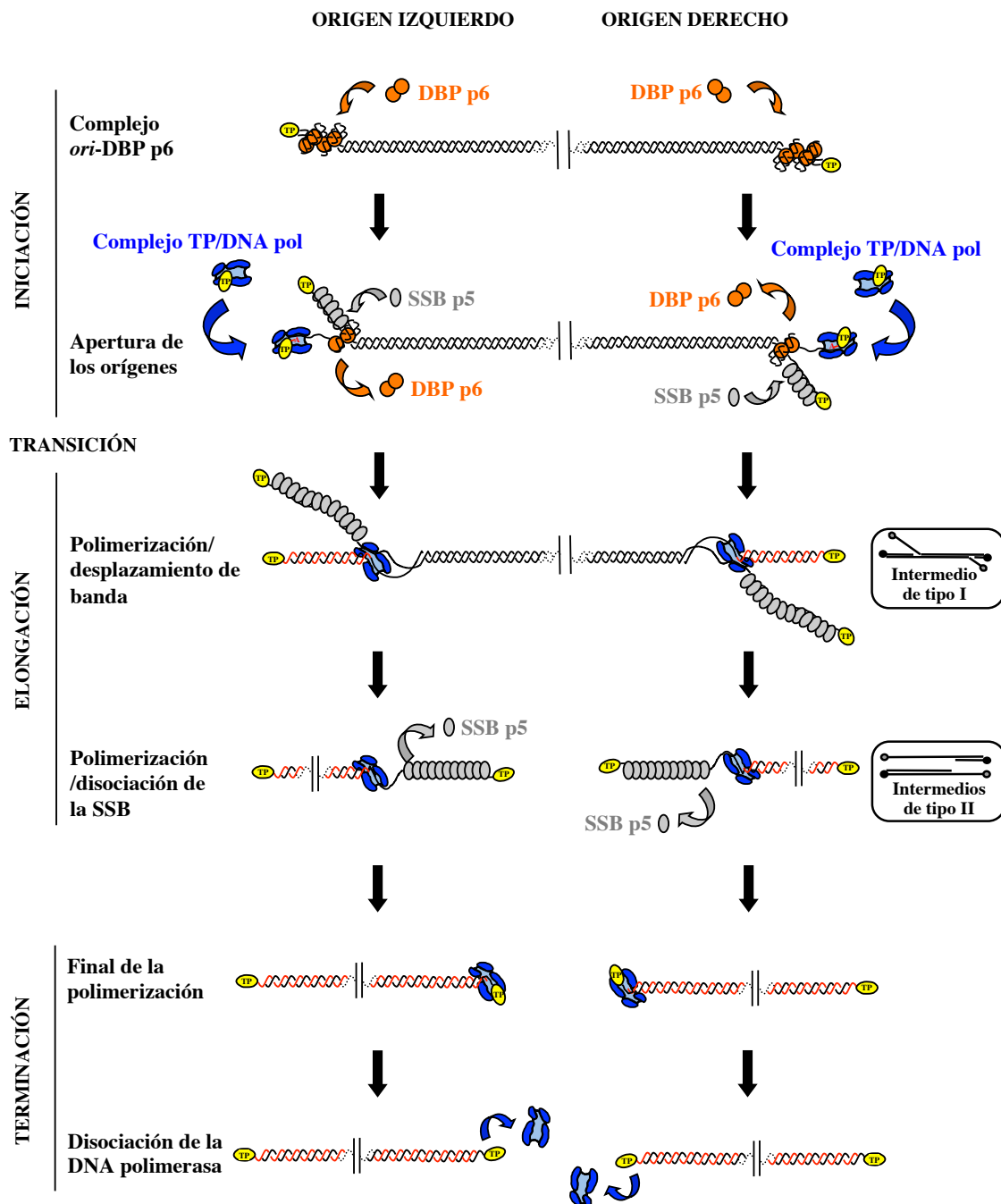


Fig. 4. Replicación del DNA del bacteriófago $\phi 29$. La iniciación de la replicación tiene lugar cuando los orígenes a los que se une la proteína p6 (círculos naranjas) son reconocidos por el heterodímero formado por la TP iniciadora o p3 (óvalos amarillos) y la DNA polimerasa o p2 (en color azul). La proteína p5 SSB (óvalos grises) se une a la hebra desplazada. Durante la elongación, la DNA polimerasa sintetiza la nueva cadena de DNA de manera procesiva y acoplada a desplazamiento de banda, generándose los intermedios replicativos de tipo I. Cuando las DNA polimerasas que provienen de ambos extremos convergen, los intermedios replicativos de tipo I se separan para dar lugar a los intermedios replicativos de tipo II y la DNA polimerasa desplaza la proteína SSB p5. Finalmente, la terminación de la replicación ocurre cuando la DNA polimerasa alcanza el extremo final de la cadena molde, inserta el último nucleótido y se disocia de la molécula de DNA recién replicada.

dNTPs y se incrementa la tasa de elongación de la DNA polimerasa (Martín and Salas, 1988; Soengas *et al.*, 1992). Finalmente, se produce la incorporación del último nucleótido complementario a la cadena molde en cada uno de los extremos del DNA de $\phi 29$, las DNA polimerasas se disocian y se obtienen dos genomas completos de $\phi 29$.

2.3- Replicación *in vivo* del DNA de $\phi 29$

El bacteriófago $\phi 29$ desarrolla su ciclo lítico en unos 50 min a 37 °C. Para ello debe replicar su genoma y, posteriormente, encapsidar este DNA recién sintetizado. Los productos de los genes *1*, *2*, *3*, *5*, *6*, *16.7*, *17* y *56* están implicados en la replicación del DNA viral *in vivo* (Carrascosa *et al.*, 1976; Hagen *et al.*, 1976; Meijer *et al.*, 2001b; Prieto *et al.*, 1989; Serrano-Heras *et al.*, 2006; Talavera *et al.*, 1972), siendo esenciales los genes *2*, *3*, *5* y *6*. Una vez el DNA viral ha sido inyectado en la célula de *B. subtilis*, la TP parental se asocia con el nucleoide bacteriano por medio de su capacidad de unión a DNA de doble banda de manera independiente de secuencia (Muñoz-Espín *et al.*, 2010; Zaballos *et al.*, 1989), llevando consigo el DNA viral al que está covalentemente unida (ver Fig. 5A, *i-ii* y 5B). Esta asociación ocurre independientemente de la presencia de la TP cebadora. La transcripción temprana de los genes del operón del extremo izquierdo inicia el proceso por el que se sintetizarán la TP cebadora y la DNA polimerasa. Estas dos proteínas formarán un heterodímero que se dirigirá hacia el nucleoide bacteriano por medio del dominio de unión a DNA de la TP iniciadora (Muñoz-Espín *et al.*, 2010) (Fig. 5B, *ii*). El heterodímero reconocerá los orígenes de replicación, situados en los extremos del genoma, por medio de interacciones específicas con la TP parental (González-Huici *et al.*, 2000; Serna-Rico *et al.*, 2000). Después de una etapa de transición, la DNA polimerasa se disocia y continúa con una elongación procesiva acoplada a desplazamiento de banda hasta que la nueva hebra de DNA es sintetizada por completo (Fig. 5B, *iii* y *iv*). Entonces la DNA polimerasa viral se disocia del DNA y puede comenzar una nueva ronda de replicación (Fig. 5B, *v*). Mientras el proceso de replicación tiene lugar, a tiempos iniciales después de la inyección, la transcripción temprana del operón del extremo derecho del genoma viral da paso a la síntesis de la proteína p16.7 (Fig. 5A, *ii*). Esta proteína se asocia a la membrana bacteriana y se organiza formando hélices a lo largo de la célula infectada (Fig. 5A, *iii-v*). Dichas hélices dependen de la presencia de proteínas del citoesqueleto

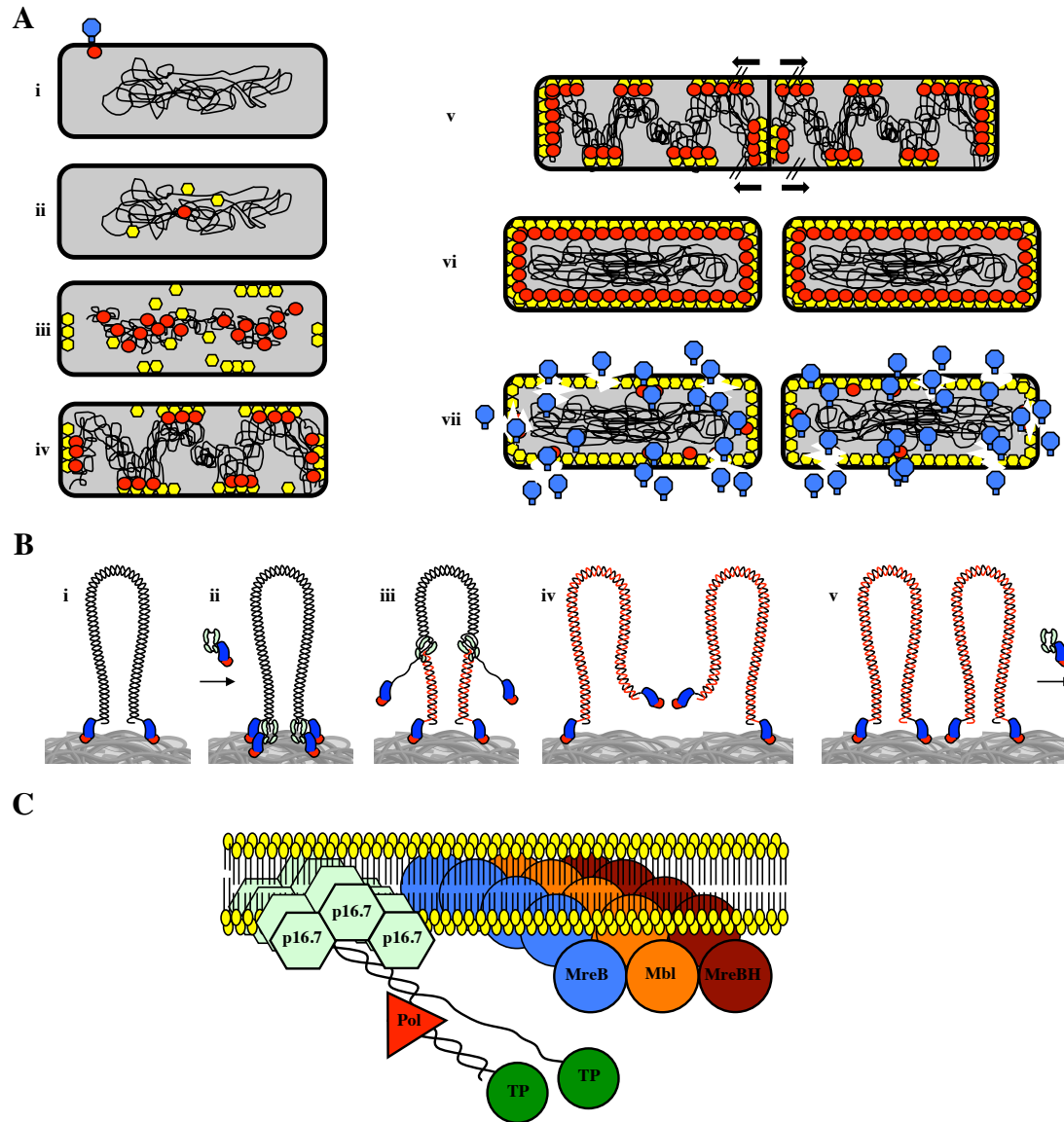


Fig. 5. Modelo de la replicación del DNA del fago $\phi 29$ *in vivo*. (A, i) El fago $\phi 29$ (en color azul) inyecta el TP-DNA (círculo rojo) en la bacteria *B. subtilis*. La TP unida covalentemente al DNA dirige éste hacia el nucleóide (ii) por medio de su capacidad de unión al DNA de manera inespecífica y se asocia con el DNA bacteriano. (iii) El TP-DNA es replicado y se generan nuevas moléculas de TP-DNA mientras se sintetiza la proteína p16.7 (círculos amarillos), que se asocia con la membrana bacteriana. (iv) El TP-DNA es reclutado por p16.7 a la zona de membrana, distribuyéndose con un patrón helicoidal a la par que el DNA bacteriano se replica y se transloca helicoidalmente. (v) Formación del septo transversal de peptidoglicano. (vi) Dos células hijas son el resultado del crecimiento y la división bacteriana. La proteína p16.7 y el TP-DNA se mantienen asociados a la membrana bacteriana. (vii) Lisis bacteriana y salida de los fagos ensamblados al exterior. (B, i) Después de la inyección del TP-DNA (doble hélice con la TP representada en azul y rojo), la TP parental dirige el genoma viral hacia el nucleóide bacteriano (masa gris en la parte inferior) por medio de su dominio N-terminal (zona roja de la TP). (B, ii) La DNA polimerasa viral (verde suave) forma un heterodímero con la TP iniciadora, que reconoce el origen de replicación de cada extremo del genoma viral y comienza la replicación, que continúa de forma procesiva y acoplada a desplazamiento de banda (iii). Se forman dos moléculas de TP-DNA a partir de la molécula inicial (iv) y permanecen asociadas al nucleóide para comenzar una nueva ronda de replicación (v). (C) Representación esquemática de la asociación del TP-DNA del fago $\phi 29$ a la membrana bacteriana en fases tardías. La proteína p16.7 (verde suave) se asocia a la membrana bacteriana y al citoesqueleto formado por las proteínas MreB (azul), Mbl (naranja) y MreBH (marrón) y, a su vez, une el TP-DNA viral mediante su capacidad de unión a DNA de banda doble y simple. TP en verde y DNA polimerasa en rojo. En (A), (B) y (C), ninguno de los componentes que aparecen están representados a escala.

de la bacteria, ya que en ausencia de cualquiera de estas proteínas (MreB, Mbl o MreBH) la proteína p16.7 pierde ese patrón de localización (Muñoz-Espín *et al.*, 2009). El TP-DNA del fago $\phi 29$ se segrega hacia zonas periféricas de la membrana bacteriana, a la vez que el DNA bacteriano de nueva síntesis se transloca hacia los polos celulares. Por medio de la capacidad de unión a DNA de banda doble y simple de la proteína p16.7, el TP-DNA de $\phi 29$ se asociaría en las proximidades de la membrana de *B. subtilis*, donde se seguiría replicando (Albert *et al.*, 2005; Meijer *et al.*, 2001b; Serna-Rico *et al.*, 2002) (Fig. 5A, *iv-vi* y 5C). Finalmente, los genomas de $\phi 29$ se introducirían en la cápsida viral recién ensamblada y los nuevos virus saldrían al exterior mediante la lisis de la bacteria (Fig. 5A, *vii*).

Además de las proteínas anteriormente comentadas, a saber: p2, p3, p5, p6 y p16.7, las proteínas p1 y p17 tienen un papel importante en la replicación del DNA del fago $\phi 29$ y el conocimiento acumulado sobre ellas se expone a continuación.

3- La proteína p1 del fago $\phi 29$

La proteína p1 del bacteriófago $\phi 29$ es una proteína pequeña (85 aminoácidos) de 9761 Da, que es codificada por el gen *I* (Prieto *et al.*, 1989). El gen *I* está localizado en el extremo izquierdo del genoma viral y es transcrito a partir de los promotores fuertes *A2b* y *A2c* y del promotor débil *AIIV* (Barthelemy *et al.*, 1986; Bravo *et al.*, 2000; Sogo *et al.*, 1984). Se sabe que el número de moléculas de p1 por célula es de alrededor de 10^4 a tiempos tempranos y pasa a aproximadamente 10^5 a tiempos tardíos post-infección, existiendo una proporción constante de 60 veces más y unas 3 veces más de p1 respecto de p2 y p3, respectivamente (Bravo and Salas, 1997).

La proteína p1 aumenta la eficiencia de la replicación del DNA viral *in vivo*, jugando un papel crítico cuando la bacteria está creciendo a 37 °C (Bravo and Salas, 1998). Esto se observó usando el fago $\phi 29$ *sus1*(629), un mutante del fago $\phi 29$ que tiene una mutación condicional sensible a supresor (*sus*) en el codón 6 del gen *I*. En células no supresoras infectadas por este fago, no hay síntesis de la proteína p1 y hay una tasa reducida de replicación del DNA viral. Por otra parte, si se infecta con este fago una estirpe no supresora que contiene el plásmido sin el gen *I*, la replicación del DNA viral está también reducida. Sin embargo, cuando se infectó una estirpe no supresora que lleva el plásmido que contiene el gen *I*, se observó que la replicación del DNA viral

volvía a una tasa normal. Por tanto, la proteína p1 complementa en *trans* la replicación del fago $\phi 29$ *sus1*(629) y es necesaria para que la replicación del DNA viral tenga lugar a 37 °C (Bravo and Salas, 1997; Serrano-Heras *et al.*, 2003).

La proteína p1 posee la capacidad de formar estructuras multiméricas. Un mutante que carece de los 33 primeros aminoácidos de la proteína p1 (p1 Δ N33) forma láminas bidimensionales *in vitro* y la proteína p1 fusionada con la proteína MalE (MalE no tiene capacidad de autoasociación), autoasocia *in vitro* produciendo estructuras largas filamentosas, que se unen entre sí formando haces al separar la proteína malE respecto de p1 (Bravo and Salas, 1998). Estas estructuras se parecen a láminas de protofilamentos formadas por la tubulina eucariótica, el principal componente de los microtúbulos, y por FtsZ, homólogo procariota de la tubulina que constituye el componente más importante de la maquinaria de división bacteriana (Bravo and Salas, 1998; Lowe and Amos, 1998). Se ha visto que cambios de aminoácidos en la región media de la proteína p1 cambian el patrón de multimerización de láminas bidimensionales a estructuras largas filamentosas (Bravo *et al.*, 2001). Esto indica que la proteína p1 actúa como un dominio de polimerización. Por otro lado, mediante estudios de entrecruzamiento químico con el agente bis(sulfosuccinimidil)suberato (BS³), se comprobó que la proteína p1 forma estructuras multiméricas *in vivo* (Serrano-Heras *et al.*, 2003).

Otra característica de la proteína p1 es que es una proteína de membrana. Experimentos de fraccionamiento celular, ensayos de solubilización con el detergente Triton X-114 y el uso de técnicas de inmunomicroscopía electrónica, muestran que la proteína p1 está asociada a la membrana bacteriana en células de *B. subtilis* (Bravo and Salas, 1997; Serrano-Heras *et al.*, 2003). Además, las estructuras multiméricas formadas por la proteína p1 están asociadas a la membrana bacteriana *in vivo* en células infectadas. La asociación de las estructuras multiméricas de la proteína p1 a la membrana también se ha visto en células no infectadas de *B. subtilis* que llevan el plásmido que contiene el gen *I*, por lo que p1 está asociada a la membrana bacteriana en ausencia de otros componentes virales (Serrano-Heras *et al.*, 2003). La región C-terminal de la proteína p1 comprendida entre los aminoácidos Tyr68 a Ala84 es muy hidrofóbica y podría estar involucrada en su asociación a membrana, ya que se ha comprobado que una proteína p1 truncada que carece de los últimos 43 aminoácidos no se asocia con membranas *in vivo* (Bravo and Salas, 1997). Por último, se observó que

un mutante de la proteína p1 que carece de los últimos 11 aminoácidos y otro que carece de los 43 últimos aminoácidos interaccionan *in vitro* con la TP libre (Bravo *et al.*, 2000).

Todos estos resultados llevaron a proponer un modelo para la función de la proteína p1 durante la replicación del DNA de $\phi 29$. La proteína p1 formaría una estructura multimérica asociada a la membrana bacteriana, a la que se asociarían los componentes del replisoma viral (formado por la DNA polimerasa y la proteína terminal iniciadora). De esta forma, p1 contribuiría a la compartimentalización de la replicación del DNA viral (Bravo *et al.*, 2000).

4- La proteína p17 del fago $\phi 29$

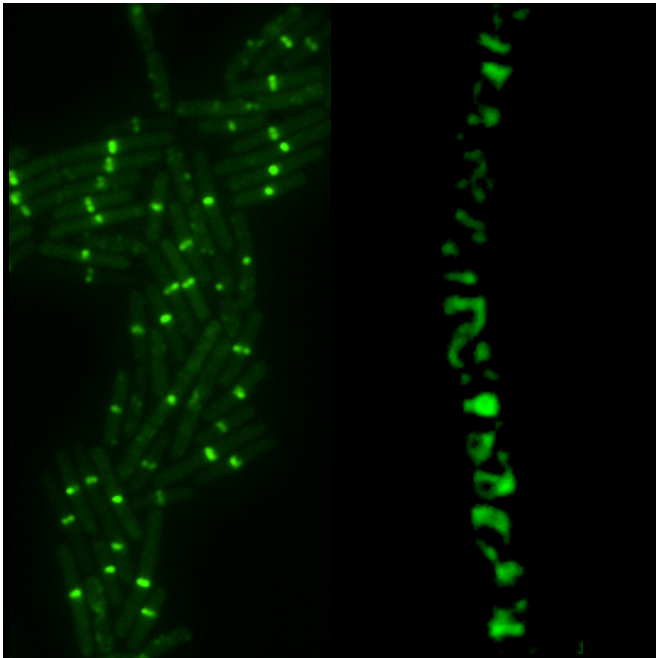
La proteína p17 es una proteína de 19 KDa (166 aminoácidos) codificada por el gen *I7* (localizado en el extremo derecho del genoma del fago $\phi 29$) y transcrita a partir del promotor *C2*. El producto del gen *I7* se acumula muy tempranamente durante el ciclo viral de $\phi 29$. A los 5 min post-infección, la proteína p17 fue detectada mediante anticuerpos contra p17 en *Western-blot* a niveles de 15.000 moléculas por célula (Crucitti *et al.*, 1998).

Una función biológica de la proteína p17 es la de internalizar el DNA del fago en la bacteria durante la infección. El genoma entraría en la célula mediante un mecanismo de empuje y tracción. La fase de empuje estaría facilitada por la alta presión a la que está empaquetado el DNA en la cápsida viral e introduciría alrededor de un 65% del DNA total. Existe polaridad en la inyección del DNA viral, internalizándose primero el DNA del extremo derecho del genoma del fago $\phi 29$. En la fase de tracción, la p17 actuaría para tirar del DNA que queda todavía en la cápsida hacia el interior celular (González-Huici *et al.*, 2004b).

También se sabe que la proteína p17 es necesaria para una replicación eficiente del DNA viral *in vivo* (Carrascosa *et al.*, 1976; Crucitti *et al.*, 1998; González-Huici *et al.*, 2004a), siendo indispensable cuando las células de *B. subtilis* son infectadas con una baja proporción de moléculas de fago (Crucitti *et al.*, 1998), que es como probablemente ocurre la infección en la naturaleza. La ausencia de la proteína p17 en la replicación *in vivo* del DNA del fago $\phi 29$ *susI7(112)* provoca una tasa de replicación muy baja, siendo la cantidad de DNA sintetizado por el mutante $\phi 29$ *susI7(112)* unas

13 veces menor que la del fago $\phi 29$ *sus14*(1242) a los 60 min post-infección (González-Huici *et al.*, 2004a). Además, la proteína p17 purificada estimula la amplificación del DNA de $\phi 29$ *in vitro* cuando se usan cantidades pequeñas de DNA viral de partida (Crucitti *et al.*, 1998). Experimentos de ultracentrifugación analítica y de entrecruzamiento químico, tanto *in vitro* como *in vivo*, han demostrado que la proteína p17 tiene capacidad de autoasociación, probablemente debido a una región de tipo *coiled-coil* entre los aminoácidos Leu63 y Glu92 (Crucitti *et al.*, 2003).

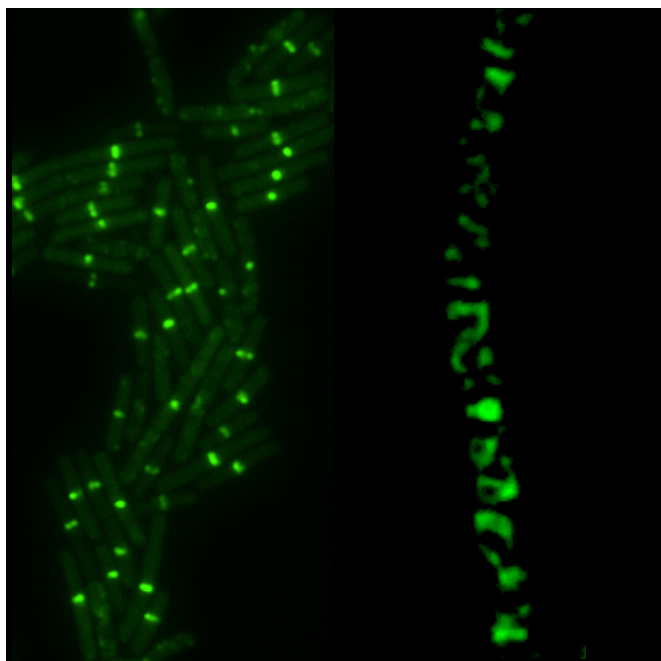
Además de esto, se ha observado que la proteína p17 interacciona *in vitro* con la proteína viral p6 y que aumenta la capacidad de unión a DNA de la proteína p6 *in vitro* (Crucitti *et al.*, 2003). Por otra parte, parece que la unión de la proteína p6 al DNA viral *in vivo* se ve favorecida por la presencia de la proteína p17, ya que en la infección con un fago *sus17*, que no sintetiza la proteína p17, la proteína p6 se une peor al DNA viral, respecto de lo que ocurre en una infección silvestre. De forma análoga, durante la infección con un fago *sus1*, que es incapaz de sintetizar la proteína p1, la proteína p6 se une peor al DNA viral que en una infección silvestre, indicando que la proteína p1 es también requerida para la unión eficiente de la proteína p6 al DNA de $\phi 29$ (González-Huici *et al.*, 2004a). De esta manera, las proteínas p17 y p1 son requeridas para una unión eficiente de la proteína p6 al DNA viral *in vivo*.



Objetivos

Antes del inicio de esta tesis, se desconocían bastantes aspectos de la organización de la replicación del DNA de $\phi 29$ *in vivo*. En particular, los que se refieren a la organización subcelular de la proteína p1 y la proteína p17. Con el objetivo de profundizar en la función y organización de estas dos proteínas durante la replicación del DNA de $\phi 29$ *in vivo*, se han propuesto los siguientes objetivos:

- 1- Conocer cuál es la región de la proteína p1 que la mantiene asociada con la membrana bacteriana.
- 2- Realizar una aproximación a la estructura secundaria de la proteína p1.
- 3- Examinar la localización de la proteína p1 en células infectadas.
- 4- Determinar la localización de la proteína p1 en ausencia de otros componentes virales.
- 5- Comprobar si la proteína p1 se asocia con otros componentes virales o celulares.
- 6- Determinar el papel biológico de la proteína p1.
- 7- Examinar la localización de la proteína p17 en células infectadas.
- 8- Determinar la localización de la proteína p17 en ausencia de otros componentes virales.
- 9- Investigar posibles asociaciones de la proteína p17 con otras proteínas virales o celulares.



Materiales y Métodos

Estirpes bacterianas, fagos y condiciones de crecimiento

Se utilizó *Escherichia coli* DH5 α y XL1-Blue para clonajes y *E. coli* BL21(DE3) para expresiones proteicas. Para la selección de los plásmidos clonados, las células de *E. coli* se crecieron en placas con medio Luria-Bertani (LB) que contenía 100 μ g/mL de ampicilina y 1,5% (p/v) de agar. La estirpe de *B. subtilis* 168 fue considerada la estirpe silvestre a lo largo de los experimentos. Puesto que la replicación del fago ϕ 29 es inhibida por la proteína Spo0A (Castilla-Llorente *et al.*, 2006), se utilizaron estirpes con la delección del gen *spo0A* cuando los experimentos requerían infección con fago. En los experimentos de fraccionamiento celular, complementación en *trans* de la replicación del DNA de ϕ 29 y solubilización con el detergente Triton X-114, se utilizaron las siguientes estirpes de *B. subtilis*: YB886 para clonaje, 110NA como estirpe silvestre y MO-99 como estirpe supresora. Las estirpes bacterianas utilizadas y sus características más relevantes se muestran en la Tabla S1 (Anexo). El fago ϕ 29 silvestre, el fago ϕ 29 *susI*(629) mutante en el gen *I*, el fago ϕ 29 *susI4*(1242) o el doble mutante ϕ 29 *susI6.7*(48)/*susI4*(1242) se usaron para infectar las células de *B. subtilis* cuando se indica. La mutación en el gen *I4* no tiene efecto en la replicación del DNA ni en la morfogénesis del fago, pero permite el examen de la localización de proteínas del fago y del DNA a tiempos tardíos después de la infección. Los bacteriófagos usados aparecen en la Tabla S2 (Anexo).

Generalmente, las células de *B. subtilis* se crecieron durante la noche en medio LB suplementado con los antibióticos requeridos: cloranfenicol, eritromicina, kanamicina, neomicina, fleomicina o espectinomina (concentraciones finales de 5, 1, 5, 5, 1 y 100 μ g/mL, respectivamente). Además, cuando fue requerido para el crecimiento (*B. subtilis* 1801, 804 y sus variantes), se añadió 0,5 mM isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) o 0,5% (p/v) xilosa. Cuando se utilizaron estirpes mutantes en alguna proteína del citoesqueleto (MreB, Mbl o MreBH), el medio contenía 25 mM MgSO₄ para mantener la morfología celular. Los cultivos incubados por la noche fueron diluidos 1:100 en el mismo medio fresco e incubados a 37 °C para restablecer el crecimiento exponencial. Cuando las células de *B. subtilis* fueron infectadas con fago ϕ 29, ϕ 29 *susI*(629) o ϕ 29 *susI4*(1242), el medio LB fue suplementado con 5 mM MgSO₄. La expresión de YFP-p1 fue inducida mediante la adición de xilosa a concentración final de 0,5% (p/v) y para expresar FtsZ-CFP, se utilizó 1 mM de IPTG.

La proteína p1ΔC2 se sintetizó constitutivamente a partir del plásmido pPR53-p1ΔC2, mientras que la síntesis de p1ΔC5 y p1ΔC11 se indujo por temperatura, creciendo las células a 42 °C para producir la desrepresión del promotor. El vector pPR53 es de expresión constitutiva y el vector pPR54 es de expresión inducible por temperatura. Ambos están basados en el promotor P_R del bacteriófago λ y contienen el gen *ble* (resistencia a fleomicina). pPR53 contiene además el gen *neo* (resistencia a kanamicina) y pPR54 tiene el gen *cI857* que codifica un represor termosensible del promotor P_R.

Generalmente, las células de *B. subtilis* se transformaron mediante procedimientos típicos, como se describe en Formstone and Errington (2005). Para que las estirpes *B. subtilis* YB886 y 110NA entraran en estado de competencia y pudieran ser transformadas, las células se crecieron durante la noche en medio A [(NH₄)₂SO₄ 2 mg/mL, K₂HPO₄ 14 mg/mL, KH₂PO₄ 6 mg/mL, citrato trisódico 1 mg/mL, glucosa 0,5% (p/v), extracto de levadura 0,1% (p/v) y MgSO₄ 5mM] suplementado con casaminoácidos 0,02% (p/v) a 37 °C y con agitación de 180 revoluciones/min (r.p.m.), hasta que el cultivo llegó al inicio de la fase estacionaria. Entonces las células fueron incubadas a 37 °C con glicerol al 10% y con agitación de 100 r.p.m. durante 10 minutos y se congelaron alícuotas a -70 °C. Las células competentes se prepararon incubando células precompetentes en medio A suplementado con casaminoácidos 0,01% y espermina 0,5 mM durante 2 h y 30 min a 30 °C con una agitación de 180 r.p.m. En este momento, se tomaron alícuotas y se les añadió el DNA plasmídico para que la transformación tuviera lugar durante 30 minutos a 30 °C. Las células transformadas fueron cultivadas durante 45 minutos en medio LB a 37 °C para que sintetizaran las proteínas de resistencia a antibióticos y posteriormente se extendieron en medio sólido (LB que contenía agar a concentración final del 1,5%) con el antibiótico requerido para cada selección (fleomicina 1 μg/mL o kanamicina 5 μg/mL) y se incubaron a 30 °C durante una noche para que las células que habían adquirido el plásmido pudieran crecer a expensas de las que no contenían plásmido.

Construcción de plásmidos

Para generar el plásmido pSG5472/YFP-p1, el gen *I* del fago φ29 se amplificó mediante PCR con los oligonucleótidos YFPP1-XhoI (5'GAGATGCTCGAGATGGG TAAAATCTTCGATCAAG-3') y YFPP1-EcoRI (5'-GAGTCAGAATTCTCATTT

TGCACCATGTGGAGC-3'). El producto resultante fue digerido con las enzimas de restricción *XhoI* y *EcoRI*, y posteriormente ligado con el plásmido pSG5472 digerido previamente con las mismas enzimas de restricción. Se transformaron células competentes de *E. coli* con esta mezcla de ligación y se seleccionaron los transformantes resistentes a ampicilina. Una vez purificado el plásmido pSG5472/YFP-p1 se transformaron células de *B. subtilis* 168 con él y los transformantes resistentes a espectinomicina fueron examinados para seleccionar los dobles recombinantes, que son incapaces de degradar el almidón.

El plásmido pDP150/FtsZ-CFP se construyó de la siguiente manera. A partir del DNA genómico de la estirpe *B. subtilis* 1057 (Feucht and Lewis, 2001), se amplificó el fragmento de DNA correspondiente a *ftsZ-cfp* flanqueado por los sitios de restricción *NheI* y *SphI* (oligonucleótidos 5'-TCGATAGCTAGCTCTAGAAAGGAGATTCCTAGGATG-3' y 5'-CGTGATGCATGCTTACTTGTACAGCTCGTCCAT-3'), se digirió con las enzimas de restricción *NheI* y *SphI* y fue ligado con los sitios de restricción *NheI* y *SphI* del vector pDP150 (Kearns and Losick, 2005), que se integra en el locus *thrC* y que contiene el promotor $P_{hyper-spank}$ inducible por IPTG.

Para generar el plásmido pDP150/p1, el vector pDP150 fue digerido con *NheI* y *SphI* y ligado con el fragmento que contiene el gen *I* del fago $\phi 29$ y los sitios de restricción *NheI* y *SphI*. Este fragmento fue generado mediante PCR usando los oligonucleótidos p1-UNheI (5'-AACGTGCTAGCAAAAGGAGATGTTTGTAAATGGTAAAATC-3') y p1-LSphI (5'-AGTCAGCATGCTCATTTTGCACCATGTGGAGC-3')

El plásmido pT7-3/p1 Δ C11 fue generado utilizando el kit de mutagénesis dirigida "QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit" (Stratagene) con los oligonucleótidos p1 Δ C11-5' (5'-CGCCACATGGGTTATAAAGTAATAGAAGGATGACGATGACAAG) y p1 Δ C11-3' (5'-CTTGTCATCGTCATCCTTCTATTACTTTATAACCCATGTGGCG-3') con el objetivo de introducir un codón de terminación once tripletes antes del codón de terminación natural del gen *I* del bacteriófago $\phi 29$. Dicho gen había sido clonado previamente en el plásmido pT7-3 (Tabor and Richardson, 1985).

Para generar los plásmidos que contienen los genes *p1 Δ C2*, *p1 Δ C5* y *p1 Δ C11*, se han introducido codones de terminación de la traducción dentro del gen *I* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello, se usó DNA de $\phi 29$ sin proteína

terminal como DNA molde, el cebador común 5'-CGGGTACAGAGATACCTGATG-3' y un cebador específico para originar cada gen mutado: 5'-CATCGTATGAGTCAACAAAATCATTTTCAACCATGTGGAGC-3' (para *p1ΔC2*), 5'-CATCGTATGAGTCAACAAAATCATTTTGCACCATGTCAAGCACCTCCA-3' (para *p1ΔC5*) y 5'-CATTTTGCACCATGTCTGACCACCTCCAAATAACTACTTTTATAACCC-3' (para *p1ΔC11*). Posteriormente, los fragmentos de DNA que contenían los genes mutantes se digirieron con la enzima de restricción HincII y se introdujeron en el sitio de corte para la enzima de restricción StuI del vector pPR53 (Bravo and Salas, 1997) (para *p1ΔC2*) o del vector pPR54 (Serrano-Heras *et al.*, 2005) (para *p1ΔC5* y *p1ΔC11*).

Para construir los plásmidos utilizados en el experimento de doble híbrido en bacteria, se clonaron los genes *I* y *I7* del fago φ29, tanto en el extremo N-terminal, como en el extremo C-terminal de los fragmentos T18 (plásmidos pUT18 y pUT18C) y T25 (plásmidos pP25N y pKT25) (Karimova *et al.*, 1998). Los genes de φ29 fueron amplificados a partir del DNA del fago φ29 *susI4*(1242). Los productos de PCR obtenidos fueron digeridos con las enzimas de restricción BamHI y KpnI y clonados en cada uno de los cuatro vectores pUT18, pUT18C, pP25N y pKT25 digeridos con las mismas enzimas.

Para aislar el DNA plasmídico de las bacterias se utilizó un kit comercial (Promega) basado en el método de la lisis alcalina (Birnboim and Doly, 1979). La cantidad de DNA fue determinada mediante técnicas de espectrofotometría con un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000. El DNA extraído fue analizado en geles de agarosa y visualizado por tinción con bromuro de etidio 0,5 μg/mL. Cuando fue requerido, el DNA se extrajo de gel de agarosa utilizando el kit comercial QIAquick Gel Extraction (Sigma).

Experimentos de microscopía de fluorescencia

Para analizar la localización intracelular de la proteína YFP-p1, expresada en la estirpe *B. subtilis* DBP-001, se diluyeron 1:100 los cultivos celulares crecidos durante toda la noche (en medio LB que contenía 100 μg/mL espectinomicina, 5 μg/mL kanamicina y 5 mM MgSO₄) en el mismo medio fresco y se crecieron a 37 °C hasta una DO₆₀₀ de 0,45. En ese momento, se añadió xilosa a una concentración final de 0,5%

(p/v) para inducir la síntesis de YFP-p1, y la mitad del cultivo fue infectado con el fago $\phi 29$ a una multiplicidad de infección (MOI) de 5. Treinta minutos después de la inducción y la infección, se recogieron los cultivos y se inmovilizaron las células en portaobjetos cubiertos con una fina capa de agarosa al 1% (p/v). Para teñir la membrana bacteriana se utilizó dibromuro de N-(3-propiltrietilamonio)-4-(6-(4-(dietilamino)fenil)hexatrienil)piridinio (FM 4-64, Invitrogen). Se usó el mismo procedimiento para visualizar la localización de YFP-p1 en presencia o ausencia de las proteínas FtsZ o PBP2B. El medio LB estaba suplementado con 100 $\mu\text{g/mL}$ de espectinomicina y 1 $\mu\text{g/mL}$ de fleomicina para la estirpe *B. subtilis* DBP-003 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de espectinomicina, 5 $\mu\text{g/mL}$ de neomicina y 5 $\mu\text{g/mL}$ de cloranfenicol para *B. subtilis* DBP-004. Se añadió 0,5 μM IPTG y 0,5% (p/v) xilosa para analizar la localización de YFP-p1 en un contexto silvestre. La localización de p17Nf-YFP se evaluó siguiendo el mismo procedimiento descrito para YFP-p1. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio de barrido láser confocal (Zeiss LSM710 acoplado a un microscopio invertido AxioObserver).

Para determinar la colocalización de YFP-p1 y FtsZ-CFP, un cultivo de la estirpe DBP-002 crecido durante la noche en medio LB con 100 $\mu\text{g/mL}$ de espectinomicina y 1 $\mu\text{g/mL}$ de eritromicina se diluyó 1:100 en el mismo medio fresco y se creció a 37 °C hasta una DO_{600} de 0,45. A esta DO, se añadió xilosa e IPTG a concentraciones finales de 0,5% (p/v) y 1 mM, respectivamente. Al cabo de 30 minutos, las células fueron recogidas e inmovilizadas en agarosa, como se ha mencionado anteriormente. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss) acoplado a una cámara ccd monocroma (Hamamatsu C9100-02).

Para los experimentos de inmunofluorescencia, el cultivo crecido durante la noche se diluyó en el mismo medio fresco (medio LB con 5 mM MgSO_4) y se creció hasta fase exponencial a 37 °C. El cultivo se infectó con el fago $\phi 29$ a una MOI de 5 a una DO_{600} de 0,5-0,6. Cuando se utilizaron estirpes mutantes en alguna proteína del citoesqueleto (MreB, Mbl o MreBH), el medio contenía 25 mM MgSO_4 . Las muestras fueron fijadas después de 20 ó 30 minutos y procesadas como se ha descrito (Lewis and Errington, 1997). Los anticuerpos policlonales fueron centrifugados durante 10 minutos a 14.000 x g a 4 °C antes de usarlos, para precipitar posibles agregados. Los anticuerpos primarios se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con FITC (isotiocianato de fluoresceína), con

Alexa 488 o con Alexa 647 y se incubaron a 4 °C durante la noche. Éstos y todos los pasos siguientes se realizaron con mínima exposición de las muestras a la luz. Cuando fue requerido, las muestras se montaron con 0,2 µg/mL DAPI.

Ensayo de *pull-down*

Las estirpes de *B. subtilis* 168His y 168 $\Delta spo0A$ se crecieron durante la noche a 30 °C en medio LB suplementado con 5 µg/mL de kanamicina y 0,5 mM IPTG (también con 0,5 µg/mL de eritromicina en el caso de 168His). Posteriormente, los cultivos fueron diluidos 1:100 en medio LB suplementado con 5 mM MgSO₄ y 0,5 mM IPTG y crecidos a 37 °C hasta una DO₆₀₀ de 0,45. A esta DO, se infectó la mitad de cada cultivo con el fago mutante $\phi 29$ *sus14*(1242) y los cultivos fueron crecidos durante 30 minutos a 37 °C. Un cuarto de cada cultivo se conservó a 4 °C y el resto se incubó con formaldehído [concentración final de 1% (p/v)] durante 30 minutos a 37 °C. Después, todas las células fueron centrifugadas a 11.900 x g durante 5 minutos, resuspendidas en 12 mL de tampón TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl) y centrifugadas de nuevo a 11.900 x g durante 3 minutos. Todos los pellets fueron guardados a -80 °C. Para el *pull-down*, una porción de las células fueron resuspendidas en 3 mL de tampón UT [100 mM ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacínil-etanosulfónico (HEPES), pH 7,5, 500 mM NaCl, 50 mM imidazol, 8 M urea, 1% (p/v) Triton X-100, 1 mM DL-ditiotreitol (DTT) y 1 mM fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF)] y sonicadas a 4 °C. Después de la centrifugación de las muestras a 7.750 x g durante 10 min, cada sobrenadante fue incubado con 200 µl de la suspensión MagneHis (Promega) a temperatura ambiente durante la noche. La suspensión resultante fue centrifugada a 2.800 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente y el sobrenadante fue descartado. Las partículas fueron lavadas 15 veces con tampón UT y la elución de los complejos se realizó con 200 µl de tampón de elución [0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,5 M imidazol, 1% (p/v) dodecil sulfato sódico (SDS) y 10 mM DTT]. Para descartar proteínas unidas de forma inespecífica o proteínas no entrecruzadas químicamente, el eluido fue filtrado a través de una columna Microcon-100 (Millipore), que elimina proteínas con masa molecular menor a 100 KDa. Los complejos proteicos retenidos en la membrana de la columna se lavaron 3 veces con tampón de lavado M [0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, 1% (p/v) SDS, 10 mM DTT] y se recuperaron mediante la adición de 50 µl del mismo tampón. Las muestras fueron

resuspendidas en tampón R [0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 2% (p/v) SDS, 4% (v/v) β -mercaptoetanol, 13% (v/v) glicerol], calentadas a 90 °C durante 1 hora para revertir el entrecruzamiento químico, sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con tricina y posterior transferencia por *Western-blot* e inmunodetección con anticuerpos contra p1.

Entrecruzamiento químico *in vitro*

Las proteínas FtsZ y p1 Δ C11 fueron incubadas juntas o separadamente a la concentración final de 5 μ M en tampón HM (50 mM HEPES, pH 7,5, 5 mM MgSO₄) durante 30 minutos a 4 °C. Se añadió GTP a una concentración final de 1 mM y se incubó 20 minutos a 37 °C. La reacción se dividió en dos partes y se añadió DSS (disuccinimidil suberato, 1,25 mg/mL de concentración final) a una de ellas. Seguidamente, las muestras fueron incubadas con agitación a 4 °C durante 20 minutos. Después se añadió glicina a concentración final de 250 mM y se incubó a 4 °C durante 5 min para detener el entrecruzamiento químico. Se añadió un volumen de ácido tricloroacético (TCA) al 20% (v/v) a las muestras y éstas se mantuvieron 20 min a 4 °C antes de su centrifugación a 22.000 x g durante 10 min. Los pellets de TCA fueron resuspendidos en un tampón compuesto por 37 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% (p/v) SDS, 4% (v/v) β -mercaptoetanol y 13% (v/v) glicerol. A continuación, se añadió 1 M Tris-HCl, pH 7,5 a las muestras para neutralizar el pH ácido. Las muestras fueron cargadas en un gel del 10 al 20% de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y se analizaron por transferencia *Western* y detección con anticuerpos contra p1 y FtsZ. Para realizar el entrecruzamiento químico *in vitro* entre las proteínas p16.7 y p17 se procedió de la misma manera, con ligeras variaciones: no se añadió GTP y las proteínas se incubaron 15 min a 37 °C. Después de añadir la glicina, se incubó 15 min en hielo.

Para realizar el entrecruzamiento químico de las proteínas p17 de Nf y p17 de ϕ 29 se prepararon estas proteínas en tampón fosfato sódico 25 mM, pH 7,0 y NaCl 50 mM y fueron posteriormente cuantificadas. Para cada reacción de entrecruzamiento, las proteínas se disolvieron hasta 15 μ M en tampón fosfato sódico 25 mM, pH 7,0, con la cantidad de NaCl requerida para que la concentración final fuese de 50, 100 ó 200 mM NaCl. En los casos en que se añadió DSS, la concentración final de DSS fue de 5 mM. La reacción de entrecruzamiento tuvo lugar a temperatura ambiente durante 30 min y se

utilizó Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 durante 15 minutos a temperatura ambiente para detener la reacción. Las proteínas de las muestras se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes.

Medida de la longitud celular de *B. subtilis*

Para determinar la longitud de las células de *B. subtilis* que expresan el gen *l*, las estirpes DBP-005 y DM-024 se crecieron durante toda la noche a 37 °C en medio LB suplementado con 1 µg/mL eritromicina (concentración final). Se diluyeron las células en proporción 1:400 en el mismo medio fresco y se crecieron a 37 °C. Cuando el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ de 0,1, se añadió IPTG a concentración final de 1 mM. Como control interno, la mitad del cultivo de DBP-005 no fue inducido. Después de 45 min (aproximadamente dos generaciones), las células se tiñeron con FM4-64 y se tomaron fotografías con un microscopio de barrido láser confocal LSM710 acoplado a un microscopio invertido AxioObserver (Zeiss). El mismo método fue utilizado para medir la longitud celular de la estirpe *B. subtilis* 168Δ*spo0A* infectada con el fago φ29 *sus14*(1242) a una MOI de 1, pero las muestras fueron tomadas a los 50 min después de la infección. Como control, la mitad del cultivo de la estirpe *B. subtilis* 168Δ*spo0A* no fue infectado. La longitud celular fue medida con el programa FIJI (ImageJ) y se consideró como la distancia entre la mitad ortogonal de un septo y la mitad ortogonal del septo adyacente. Los datos fueron analizados con GraphPad Prism.

Cuantificación de la síntesis de DNA viral

Se crecieron células de *B. subtilis* que contienen los plásmidos pPR53, pPR54, pPR53-p1, pPR53-p1ΔC2 y pPR54-p1ΔC5 en medio LB con MgSO₄ 5 mM a 40° C. Cuando el cultivo alcanzó una DO₅₆₀ de 0,45, se infectó con el bacteriófago φ29 *sus1*(629) a una MOI de 5. Después de 10 minutos de incubación a 40° C con agitación de 100 r.p.m., se eliminaron los fagos no adsorbidos mediante centrifugación. Las células fueron resuspendidas en el mismo volumen de medio precalentado y se continuó la incubación con agitación de 180 r.p.m. a 40 °C. A diferentes tiempos, cada cinco minutos, se tomaron alícuotas del cultivo infectado y se procesaron para extraer el DNA total intracelular como se describe en Bravo *et al.* (1994). El DNA total intracelular fue

analizado por electroforesis en gel de agarosa al 0,65% (p/v) y tinción con bromuro de etidio 0,5 µg/mL.

Para cuantificar el DNA sintetizado en células con mayor longitud y compararlo con el DNA sintetizado en células de longitud normal, se procedió de la siguiente manera. Las estirpes de *B. subtilis* DBP-006 y DBP-007 fueron crecidas durante la noche a 37 °C en medio LB suplementado con 5 mM MgSO₄ y los antibióticos requeridos (5 µg/mL de kanamicina para DBP-006 y 100 µg/mL de espectinomicina y 5 µg/mL de kanamicina para DBP-007). Para restablecer el crecimiento exponencial, los cultivos crecidos durante la noche fueron diluidos 1:200 en el mismo medio fresco y crecidos a 37 °C. A una DO₄₂₀ de 0.2, cada cultivo fue infectado con el fago φ29 silvestre a una MOI de 0,5 y crecido a 37 °C. A los tiempos posteriores a la infección que se indican, se cogió un mL de cultivo, se extrajo el DNA total y se analizó mediante PCR a tiempo real. Se utilizó el par de oligonucleótidos R-25 (5'-AAAGTAGGGTACAGCGACAACATAC-3') y R-OUT-SUPER (5'-AAATAGATTTTCTTTCTTGGCTAC-3') para amplificar un fragmento de 297 pares de bases (pb) correspondiente al extremo derecho del genoma de φ29, y el par de oligonucleótidos ftsZ-R (5'-CAGTGATTGCAACCGGCTTTATCG-3') y ftsZ-L (5'-TTTTGGCTCACGCTTCGGAACA-3') para amplificar un fragmento del gen *ftsZ* del DNA genómico de *B. subtilis*. Los datos obtenidos fueron interpolados en curvas estándar construidas con cantidades conocidas de DNA del fago φ29 y DNA genómico, esencialmente como se describe en González-Huici *et al.* (2004b). Como control del número de células infectadas por φ29 por mL de cultivo, se centrifugó una muestra del mismo, se lavó dos veces para eliminar fagos no adsorbidos y se diluyó 1:1000. Posteriormente, 100 µL de la dilución se mezclaron con 500 µL de células de *B. subtilis* 110NA que crecían en fase exponencial y con “*top-agar*” [0,75% agar (p/v)] y se extendieron en placas de LB-agar [1,5% agar (p/v)]. Para obtener la media de unidades formadoras de placa de lisis por mL de cultivo, se realizaron un mínimo de ocho plaques por cada estirpe en cada experimento.

Para cuantificar el DNA sintetizado en la estirpe DBP-001 y comprobar si existe complementación de la replicación con la proteína de fusión YFP-p1, se extrajo el DNA intracelular y se cuantificó mediante PCR, esencialmente como se describe en González-Huici *et al.* (2004b).

Fraccionamiento celular

Para preparar vesículas de membrana “*right-side-out*” en *B. subtilis*, se ha utilizado una modificación del procedimiento usado por Konings *et al.* (Konings *et al.*, 1973) Las células 110NA/p1, 110NA/p1ΔC2 y 110NA/p1ΔC5 se crecieron a 40° C para que ocurriese la desrepresión del promotor P_R , hasta que alcanzaron una DO₅₆₀ de 0,45. El pellet de células se lavó y se concentró 20 veces en tampón fosfato potásico 0,05 M, pH 8,0. A continuación se procedió al fraccionamiento celular de la siguiente forma: se concentraron las células veinte veces en tampón fosfato potásico 0,05 M, pH 8,0 y se añadió lisozima a una concentración final de 150 µg/mL. Las células fueron incubadas durante 15 minutos a 37 °C para que tuviera lugar la degradación de la pared celular. A continuación, se añadió DNAasa, RNAasa y MgSO₄ a las concentraciones finales de 10 µg/mL, 12 µg/mL y 10 mM, respectivamente, y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Después se añadió EDTA, pH 8,0 a una concentración final de 15 mM. Se continuó la incubación durante 15 minutos más y entonces se aumentó la concentración de MgSO₄ a 20 mM. Después de incubar durante 15 minutos a 37 °C, se añadió NaCl para que éste quedara a una concentración final de 500 mM. Se tomó una alícuota del lisado como muestra de la totalidad del contenido celular (total) y se le añadió tampón de ruptura. Para separar la fracción de membrana respecto de la fracción soluble, se centrifugó el lisado celular a 18.000 r.p.m. durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se recogió como fracción soluble y se le añadió tampón de ruptura. El sedimento contenía la fracción de membrana y se guardó a –20 °C junto con el total y la fracción soluble. En el momento de analizar las proteínas, se resuspendió la fracción de membrana en tampón de ruptura.

El procedimiento para fraccionar células de *E. coli* fue el mismo, con la variación de que para separar la fracción soluble de la fracción de membrana las muestras totales se centrifugaron a 1500 x g durante 15 minutos a 4 °C.

Sistema de doble híbrido en bacteria

Se utilizó el método de Karimova *et al.* (Karimova *et al.*, 1998). Se clonaron las secuencias que codifican la proteína p1 y la proteína p17 de φ29 entre las dianas de restricción BamHI y KpnI de los plásmidos pUT18, pUT18C, pP25N y pKT25

(Karimova *et al.*, 1998). Se transformó la estirpe *E. coli* BTH101 y se plaqueó en medio mínimo que contenía 40 µg/mL de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-galactopiranosido), 0,5 mM IPTG, 100 µg/mL de ampicilina, 50 µg/mL de kanamicina, 0,8 % de glucosa y 3 µM tiamina o bien en medio LB suplementado con 40 µg/mL de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-galactopiranosido), 0,5 mM IPTG, 100 µg/mL de ampicilina y 50 µg/mL de kanamicina. Las placas de medio mínimo fueron incubadas al menos 48 horas a 30 °C y las de medio LB, durante 24 horas a 30 °C.

Solubilización con Triton X-114 *in vivo*

Células de *B. subtilis* crecidas hasta una $DO_{560} \approx 0,45$ fueron sedimentadas y posteriormente lavadas y concentradas (seis veces) mediante resuspensión en tampón T (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 7,5). Posteriormente, se añadió lisozima, preparada en tampón T, a una concentración final de 150 µg/mL y se incubaron las células 12 minutos a temperatura ambiente para que tuviera lugar la degradación de la pared celular (con frecuencia se agitaba muy suavemente la solución). Después se centrifugó cada muestra durante 4 minutos a 10.000 r.p.m. y el sedimento fue resuspendido en una solución enfriada a 4 °C compuesta por Triton X-114 disuelto al 2% (v/v) en PBS. Las muestras se mantuvieron a 4 °C en rotación durante una noche para que se produjese la solubilización de los protoplastos en el detergente Triton X-114. Más tarde, para que no quedaran restos celulares o células sin solubilizar en las muestras, se centrifugaron las mismas durante diez minutos a 14.000 r.p.m a 4 °C y se descartó el sedimento. Las fases se separaron incubando las muestras a 37 °C durante 15 minutos y centrifugándolas 15 minutos a 14.000 r.p.m., a temperatura ambiente. Después, cada fase fue transferida a un tubo nuevo. Se procedió al lavado de las muestras añadiendo PBS a la fase detergente y se añadió Triton X-114 a la fase acuosa, repitiendo el proceso de partición de fases. Las proteínas de cada fase fueron precipitadas con seis volúmenes de acetona durante una noche a -20 °C. Después se centrifugaron a 14.000 r.p.m. durante 15 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante. El precipitado se dejó secar a temperatura ambiente durante 10 minutos y se resuspendió en tampón de ruptura.

Solubilización con Triton X-114 *in vitro*

Las proteínas purificadas se disolvieron por separado en una solución enfriada a 4 °C compuesta de Triton X-114 disuelto al 2% (v/v) en PBS. Las muestras se mantuvieron a 4 °C y en rotación durante una noche y después se procedió a la separación de fases incubando las muestras a 37 °C durante 15 minutos y centrifugándolas posteriormente durante 15 minutos a 14.000 r.p.m. a temperatura ambiente. Cada fase fue transferida a un tubo nuevo. Se procedió al lavado de las muestras añadiendo PBS a la fase detergente y Triton X-114 a la fase acuosa. Se repitió el proceso de partición de fases y las proteínas de cada fase fueron precipitadas con seis volúmenes de acetona durante una noche a -20 °C. Después, se centrifugaron a 14.000 r.p.m. durante 15 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante. El precipitado se dejó secar a temperatura ambiente durante 10 minutos y se resuspendió en tampón de ruptura.

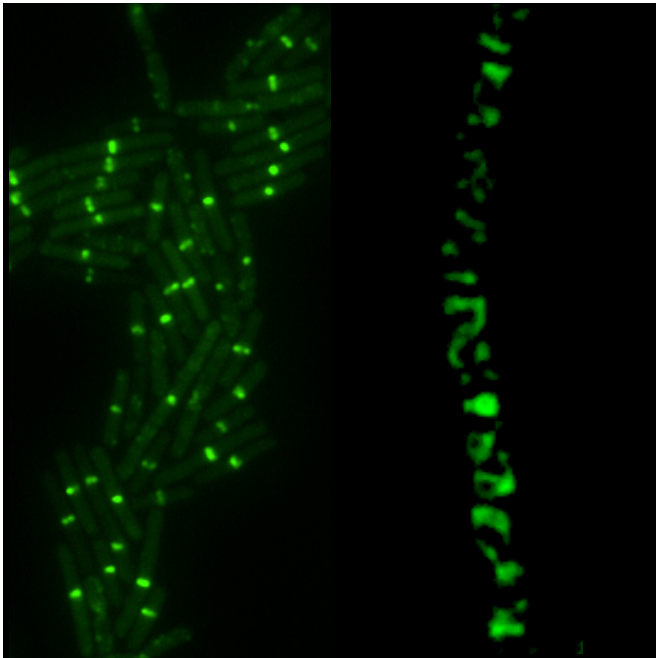
Dicroísmo circular

Para estimar la estructura secundaria mediante dicroísmo circular (DC), se preparó la proteína mutante p1ΔC11 a una concentración de 20 μM en tampón fosfato sódico 25 mM, pH 7,0 que contenía 100 mM NaCl. Cada espectro de DC representa la media de ocho escaneados entre 190 y 250 nm de longitud de onda, realizados a 25 °C con un espectropolarímetro JASCO J-600, equipado con un baño de agua NESLAB RTE-100 conectado a un ordenador. El análisis de la estructura secundaria se realizó mediante el uso de DICHROWEB (Whitmore and Wallace, 2004, 2008) (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>), que incluye los programas públicos CONTINLL (Provencher and Glockner, 1981; van Stokkum *et al.*, 1990), VARSLC (Teeter and Whitlow, 1988), K2d (Andrade *et al.*, 1993), CDSSTR (Compton and Johnson, 1986), y SELCON3 (Lees *et al.*, 2006a; Sreerama *et al.*, 1999), que estiman los porcentajes de estructura secundaria basándose en un amplio rango de bases de datos de espectros derivados de proteínas solubles y de membrana (Abdul-Gader *et al.*, 2011; Lees *et al.*, 2006b; Sreerama *et al.*, 2000; Sreerama and Woody, 2000). Como parámetro para medir la bondad del ajuste entre los espectros calculados a partir de la estructura secundaria predicha y el espectro determinado experimentalmente, se utilizó

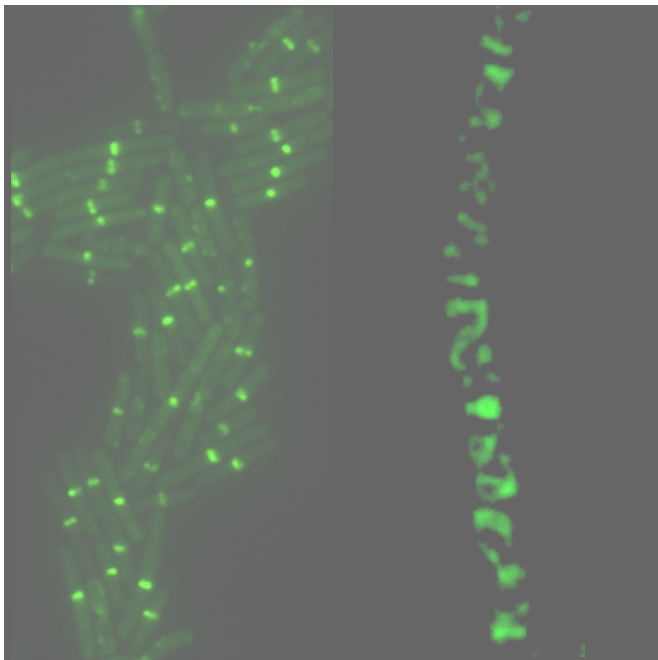
la NRMSD (*normalized root mean square deviation*) (Kelly *et al.*, 2005; Mao *et al.*, 1982). Los valores de la NRMSD <0,1 muestran que los espectros experimentales y los calculados presentan alta concordancia.

Cuantificación de la producción de fago

Se tituló el número de unidades formadoras de placa de lisis (PFUs) por mL de cultivo infectado a los 50 min post-infección. Para ello, se crecieron células de las estirpes DBP-006 y DBP-007, como se ha descrito anteriormente. Cuando alcanzaron una DO_{420} de 0.2 en fase exponencial, dichas células se infectaron con el fago $\phi 29$ silvestre a MOI de 0,5. A los 50 min post-infección, se tomó una muestra de 100 μ L de cultivo infectado y se diluyó de forma seriada en diluyente de fago (50 mM Tris-HCl, pH 7,8, 10 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl). Se mezclaron 100 μ L de las diluciones con 500 μ L de células de *B. subtilis* 110NA que crecían en fase exponencial y con 2,5 mL de “*top-agar*” [0,75% agar (p/v)]. Rápidamente se extendieron por duplicado en placas de LB-agar [1,5% agar (p/v)], que se incubaron durante la noche a 37 °C. Se contó el número de PFUs y se estimó el número de PFUs por mL de cultivo, multiplicando por el factor de dilución. La cuantificación de la producción de $\phi 29$ a los 50 min se realizó en 7 experimentos. Como control, se llevó a cabo una cuantificación del número de células infectadas (ver anteriormente) y se observó que las células DBP-006 y DBP-007 se infectaban por igual (ver Tabla T3 en Resultados).



Resultados



Capítulo I

Papel de la región C-terminal
de la proteína p1
del bacteriófago $\phi 29$
en su asociación
con la membrana
bacteriana

Las proteínas p1ΔC2 y p1ΔC5 se asocian a la membrana bacteriana

Se ha demostrado que la proteína p1 del fago $\phi 29$ se asocia con la membrana bacteriana en células de *B. subtilis* infectadas (Bravo and Salas, 1997). Además, se ha observado que la proteína p1 expresada en *trans* por medio de un plásmido también es recuperada en la fracción de membrana (Serrano-Heras *et al.*, 2003), por lo que esta proteína no necesita de otros componentes virales para asociarse con la membrana bacteriana. La región C-terminal de la proteína p1 tiene un marcado carácter hidrofóbico por su gran proporción de aminoácidos apolares y, por lo tanto, podría estar involucrada en la asociación de esta proteína con la membrana bacteriana. Se sabe que la proteína p1ΔC43, una proteína p1 truncada que carece de los últimos 43 aminoácidos, no está asociada a la membrana *in vivo*, aunque conserva su capacidad de interactuar con la proteína terminal iniciadora *in vitro* (Bravo *et al.*, 2000; Bravo and Salas, 1997). Para determinar si la región C-terminal de la proteína p1 es responsable de la asociación a la membrana bacteriana, se realizaron mutaciones para deleccionar dos, cinco y once aminoácidos del extremo C-terminal. Estas delecciones se seleccionaron comparando la secuencia de aminoácidos conservados en fagos relacionados con $\phi 29$ (ver Fig. 6).

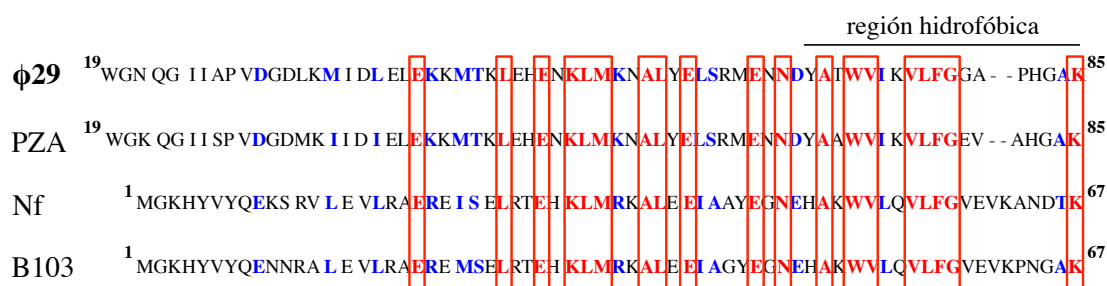


Fig. 6. Secuencias aminoacídicas de la proteína p1 y proteínas homólogas de fagos de la familia de $\phi 29$. En rojo se muestran los aminoácidos idénticos y en azul, los homólogos. Los últimos once aminoácidos de la proteína p1 de $\phi 29$, que constituyen una región hidrofóbica, tienen una región de cuatro aminoácidos contiguos que está completamente conservada (VLFG).

De esta manera, se clonaron las secuencias que codifican las tres proteínas delecionadas y se comprobó que, tanto la variante de p1 que carece de los últimos dos aminoácidos (p1ΔC2), como la variante de p1 que carece de los últimos cinco aminoácidos (p1ΔC5), se sintetizaban correctamente en células de *B. subtilis* (ver Fig.

7). Sin embargo, la variante de p1 que carece de los últimos once aminoácidos (p1 Δ C11) no fue detectada mediante *Western-blot*.

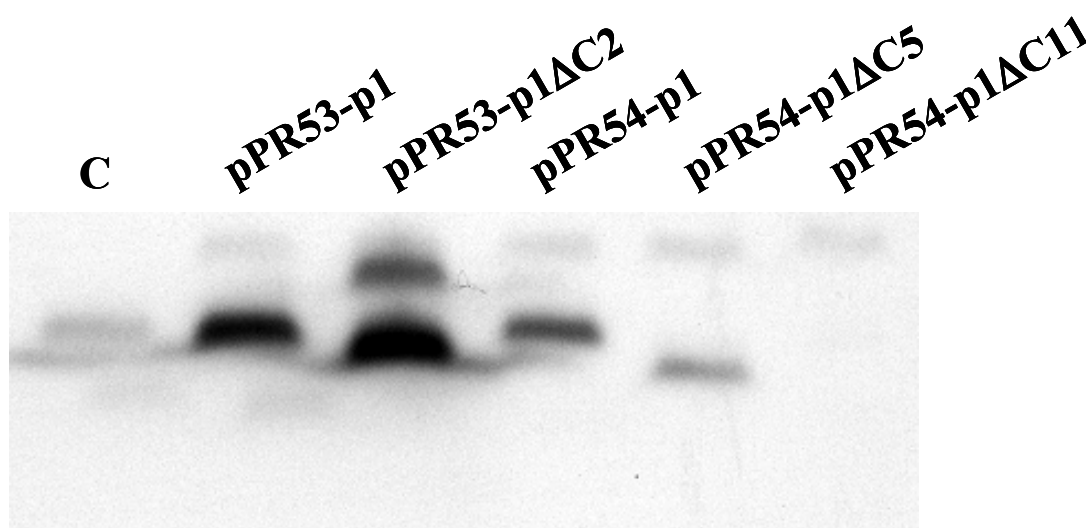


Fig. 7. Análisis por *Western-blot* de lisados celulares utilizando anticuerpos anti-p1. Los lisados proceden de células de *B. subtilis* transformadas con el plásmido indicado y que fueron crecidas en condiciones de inducción de la síntesis de la proteína codificada en el plásmido. C: proteína p1.

Para analizar si las proteínas p1 Δ C2 y p1 Δ C5 expresadas en *trans* están asociadas a la membrana en células de *B. subtilis*, se realizaron experimentos de fraccionamiento celular en los que se separó la fracción soluble de la fracción de membrana, básicamente como está descrito en Konings *et al.* (1973) (ver Materiales y Métodos). Las proteínas de cada fracción fueron separadas en geles de poliacrilamida con SDS y tricina, y después se transfirieron mediante electroforesis a una membrana de Immobilon-P, que fue incubada con anticuerpos anti-p1. Como control se utilizaron células que sintetizan la proteína p1. Como se muestra en la Fig. 8, las proteínas p1 Δ C2 y p1 Δ C5 fueron recuperadas en la fracción de membrana, tal y como ocurre con p1, lo que indica que los últimos cinco aminoácidos de la proteína p1 no son esenciales para su interacción con la membrana.

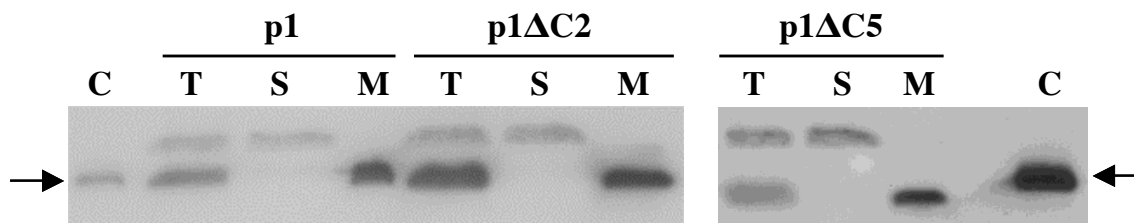


Fig. 8. Las proteínas mutantes p1ΔC2 y p1ΔC5 se recuperan en la fracción de membrana. Células de *B. subtilis* que sintetizaban las proteínas indicadas en la parte superior de la figura fueron fraccionadas. Las proteínas del lisado celular total (T), de la fracción soluble (S) y de la fracción de membrana (M), fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS-tricina. Después, se analizaron por *Western-blot* utilizando anticuerpos anti-p1. C: proteína p1. → indica la posición de p1.

Las proteínas p1ΔC2 y p1ΔC5 complementan en *trans* la replicación del fago mutante $\phi 29$ *susI*(629)

En estudios previos se demostró que, en ausencia de la proteína p1, la eficiencia de la replicación del DNA del fago $\phi 29$ *in vivo* se ve afectada, especialmente cuando la bacteria crece a 37 °C (Bravo and Salas, 1997, 1998). En dichos estudios se utilizó el fago mutante $\phi 29$ *susI*(629), que no sintetiza la proteína p1 en un fondo genético no supresor (*su*), y se comparó la cantidad de DNA viral producido en la replicación de $\phi 29$ *susI*(629) en células infectadas con este fago mutante con la cantidad de DNA viral producido en células infectadas con el fago $\phi 29$ silvestre. Además, se sabe que la proteína p1 codificada por medio de un plásmido complementa en *trans* la replicación de $\phi 29$ *susI*(629) (Serrano-Heras *et al.*, 2003). Para estudiar si las proteínas p1ΔC2 y p1ΔC5 son funcionales, se realizaron ensayos de complementación en *trans* de la replicación del fago $\phi 29$ *susI*(629). Cuando células de *B. subtilis* 110NA (*su*) que llevan el vector pPR54 (no productoras de p1) fueron infectadas por $\phi 29$ *susI*(629), la replicación del DNA viral se vio severamente afectada (Fig. 9). Sin embargo, en células de *B. subtilis* 110NA (*su*) que contenían el plásmido pPR53-p1ΔC2 o el plásmido pPR54-p1ΔC5, se retrasaron los niveles de replicación del DNA viral cuando fueron infectadas por $\phi 29$ *susI*(629), del mismo modo que ocurre en células de *B. subtilis* 110NA que contienen los plásmidos pPR53-p1 o pPR54-p1 y que sintetizan la proteína p1 silvestre (Fig. 9). Este resultado demuestra que los 5 últimos aminoácidos de la

proteína p1 no son imprescindibles para la acumulación del DNA viral durante el ciclo infectivo.

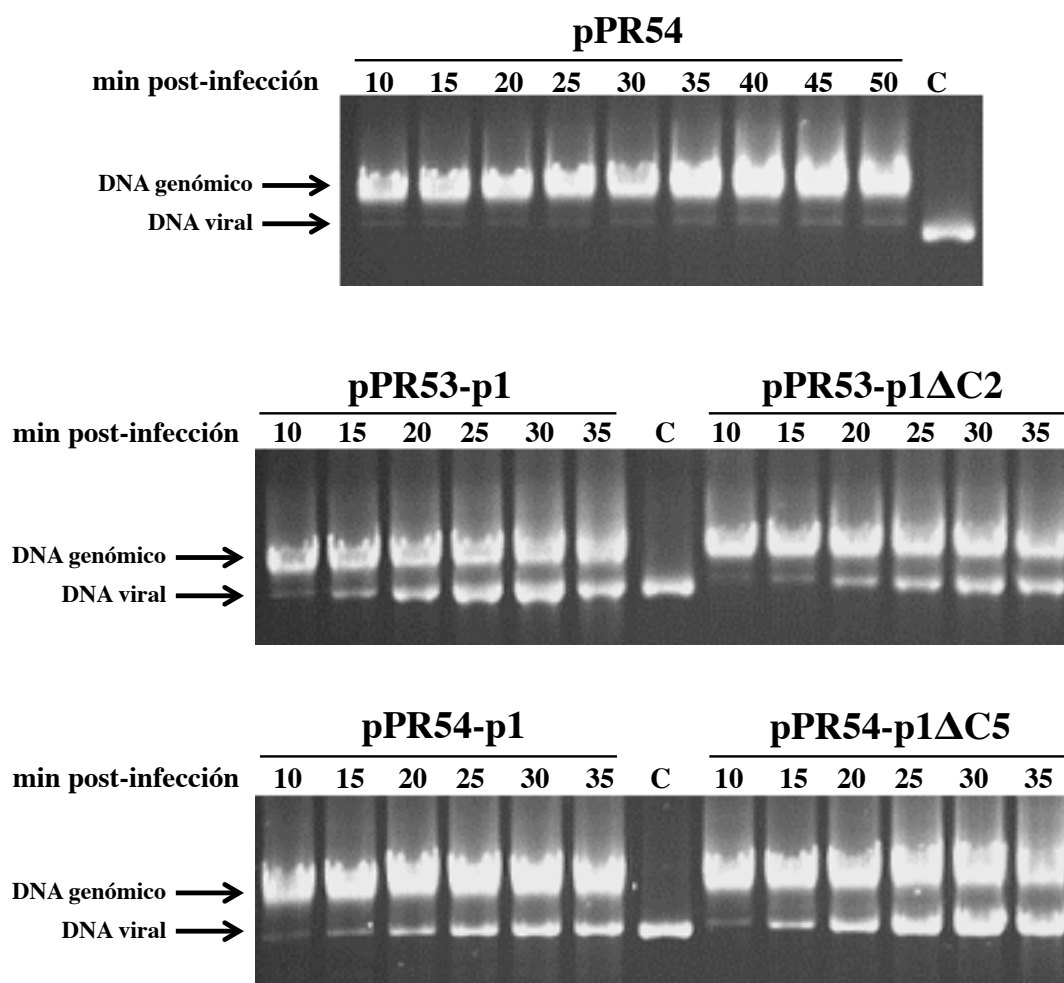


Fig. 8. Complementación en *trans* de la replicación del fago $\phi 29$ *sus1*(629). Células de *B. subtilis* 110NA (*su*) que contienen los plásmidos indicados fueron infectadas con el fago $\phi 29$ *sus1*(629). A los tiempos señalados se aisló el DNA total intracelular y se analizó por electroforesis en gel de agarosa. C: DNA de $\phi 29$ tratado con proteinasa K. → muestra la posición del DNA de $\phi 29$.

La proteína p1ΔC11 no se asocia a la membrana bacteriana

La ausencia de los últimos cinco aminoácidos de la proteína p1 no tiene influencia en la asociación a la membrana bacteriana. Pero el resto de aminoácidos hidrofóbicos en la región C-terminal podrían estar involucrados en la asociación de la proteína p1 con la membrana. Como se puede ver en la Fig. 6, los once últimos aminoácidos de la proteína p1 contienen una secuencia de cuatro residuos seguidos (VLFG), que están conservados en fagos relacionados con $\phi 29$. Dado que los cinco

últimos aminoácidos de la proteína p1 son dispensables para que la proteína se asocie a membrana y realice su función, se construyó un plásmido que contenía la secuencia que codifica una variante de la proteína p1 que carece de los últimos once aminoácidos (p1ΔC11). A esta proteína, por tanto, le falta la región de cuatro aminoácidos continuos conservados en fagos de la familia de $\phi 29$. Como ya se ha visto, se hicieron pruebas de síntesis de la proteína p1ΔC11 en células de *B. subtilis* y dicha proteína no fue detectada en los lisados (Fig. 6). Por ello, se clonó la secuencia que codifica la proteína p1ΔC11 en células de *E. coli* y se realizaron pruebas de inducción. Como se observó que en estas condiciones había síntesis de p1ΔC11 (Fig. 10), se realizaron experimentos de fraccionamiento celular en las células de *E. coli* productoras de esta proteína mutante.

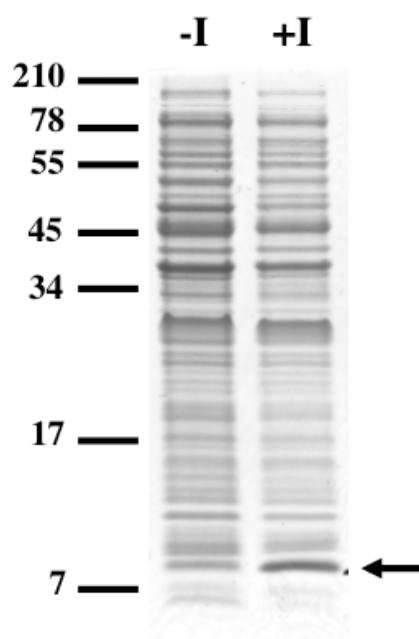


Fig. 10. Síntesis de la proteína p1ΔC11 en células de *E. coli*. Lisados celulares de una estirpe de *E. coli* que codifica la proteína p1ΔC11 fueron cargados en gel de poliacrilamida-tricina-SDS. -I: lisado de células sin inducir la expresión del gen que codifica la proteína p1ΔC11, +I: lisado de células a las que se añadió IPTG para inducir la síntesis de la proteína p1ΔC11. Los números indican el peso molecular en KDa. La flecha indica la posición de la proteína p1ΔC11.

Para ello, se crecieron las células en medio LB suplementado con ampicilina y se procedió a separar la fracción soluble de la fracción de membrana mediante una lisis celular suave y posterior centrifugación (básicamente como se realizó en las células de

B. subtilis, ver Materiales y Métodos). Como se observa en la Figura 11, la proteína p1 Δ C11 se recuperó en la fracción soluble, mientras que la proteína p1 se recuperó mayoritariamente en la fracción de membrana, igual que ocurre en *B. subtilis*. Este resultado pone de manifiesto la importancia de los últimos once aminoácidos de la proteína p1 en la asociación a la membrana bacteriana.

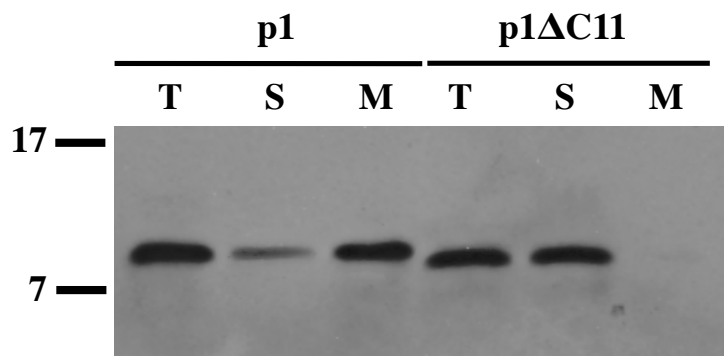


Fig. 11. La proteína p1 Δ C11 se recupera en la fracción soluble en *E. coli*. Se realizó un fraccionamiento en células de *E. coli* que sintetizaban la proteína p1 o la variante p1 Δ C11. El lisado total (T), la fracción soluble (S) y la fracción de membrana (M) se cargaron en gel de poliacrilamida que contenía SDS y tricina y se analizó el resultado mediante *Western-blot* utilizando anticuerpos contra p1. Los números indican el peso molecular en kDa.

La proteína p1 Δ C11 no tiene naturaleza anfifílica *in vitro*

Además de asociarse a la membrana bacteriana, se ha descrito que la proteína p1 tiene naturaleza anfifílica (Serrano-Heras *et al.*, 2003). Para comprobar si la delección de los últimos once aminoácidos de la proteína p1 había afectado la naturaleza anfifílica de dicha proteína, se realizaron experimentos de solubilización con la proteína p1 Δ C11 purificada y el detergente Triton X-114. Este detergente no es iónico y se utiliza para extraer las proteínas celulares totales. A 4 °C, el Triton X-114 disuelto en PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM fosfato disódico, 1,5 mM fosfato potásico) al 2%, forma una solución homogénea en la que se encuentran las proteínas totales extraídas, pero a 37 °C se forman dos fases: la fase acuosa, que contiene las proteínas hidrofílicas y la fase detergente, que contiene las proteínas anfifílicas.

La proteína p1 Δ C11 purificada se incubó en la solución de Triton X-114 al 2% en PBS a 4 °C. Posteriormente la fase acuosa se separó de la fase detergente a 37 °C

mediante centrifugación, y cada una de las fases fue lavada varias veces con la fase contraria para evitar que quedaran restos de proteína de una fase en la fracción de la otra. Se añadió acetona para precipitar la proteína de cada fase y se cargó en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Después de la electroforesis, las proteínas fueron teñidas con azul de Coomassie. Como control, se utilizó la proteína p6 del bacteriófago $\phi 29$, que es hidrofílica. Como se observa en la Fig. 12, la proteína p1 Δ C11 se recuperó en la fase acuosa. Este resultado demuestra que la proteína p1 Δ C11 tiene un carácter hidrofílico y que no tiene naturaleza anfifílica *in vitro*.

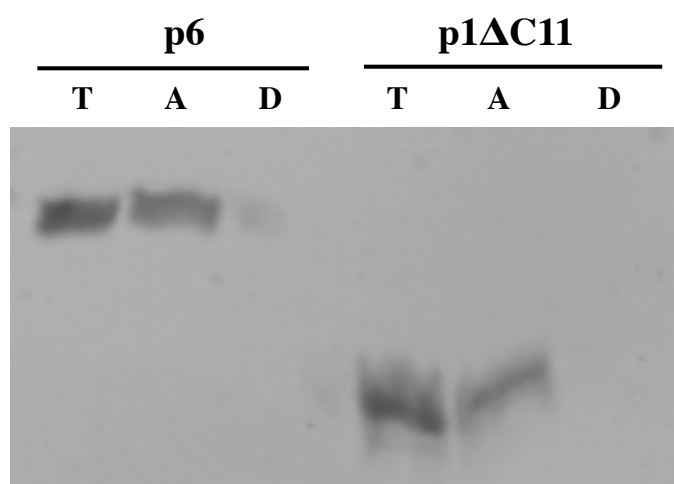


Fig. 12. La proteína p1 Δ C11 tiene naturaleza hidrofílica *in vitro*. La proteína p1 Δ C11 purificada se incubó en una solución de Triton X-114 al 2% en PBS, se separaron las fases y se lavaron. La presencia de la proteína en cada fase, se analizó mediante gel en gradiente del 10 al 20% de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con SDS. La proteína total (T), la recuperada en la fase acuosa (A) y la recuperada en la fase detergente (D) se muestran en la imagen. Como control, se utilizó la proteína p6, que es de naturaleza hidrofílica.

La proteína p1 Δ C11 no tiene naturaleza anfifílica *in vivo*

Para evaluar el efecto de la delección de los últimos once aminoácidos de la proteína p1 en su naturaleza anfifílica *in vivo*, se crecieron células de *E. coli* capaces de sintetizar p1 o p1 Δ C11, se indujo la síntesis de estas proteínas y se llevó a cabo la solubilización de los componentes celulares con Triton X-114 al 2% en PBS. Después de la separación de las fases acuosa y detergente, se procedió a lavar cada fase con su fase contraria y se precipitaron las proteínas con acetona. Las muestras fueron sometidas a electroforesis en condiciones desnaturalizantes y se realizó la detección de

las proteínas p1 y p1ΔC11 con anticuerpos purificados contra la proteína p1. Como se puede observar en la Figura 13, la proteína p1 se recuperó en su totalidad en la fase detergente, como ocurre en células de *B. subtilis* y como es típico de las proteínas anfifílicas. Sin embargo, la proteína mutante p1ΔC11 se recuperó en su totalidad en la fase acuosa, como ocurre con las proteínas de carácter hidrofílico.

Este resultado concuerda con los anteriores y demuestra que la región C-terminal (concretamente los últimos once aminoácidos) de la proteína p1 es importante para su asociación a la membrana bacteriana.

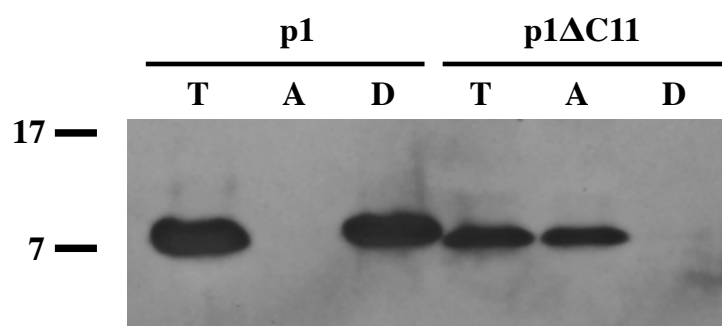


Fig. 13 La proteína p1ΔC11 se recupera en la fase acuosa en células de *E. coli*. Células de *E. coli* que contienen las secuencias que codifican la proteína señalada en la parte de arriba de la figura se crecieron hasta fase exponencial y se indujo la síntesis proteica. Al cabo de una hora, se recogieron las células y se realizó la solubilización con Triton X-114. El lisado total (T) antes de la separación de fases, la fase acuosa (A) y la fase detergente (D) se muestran en la figura después de realizar electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS-tricina y *Western-blot* utilizando anticuerpos contra la proteína p1.

La proteína p1ΔC11 tiene una estructura secundaria con un porcentaje alto de desorden

Como aproximación a conocer la estructura secundaria de la proteína p1, se ha hecho uso de la técnica de dicroísmo circular. El fenómeno de dicroísmo circular aplicado al conocimiento de la estructura secundaria de las proteínas se basa en la diferente absorción de la luz polarizada por los enlaces peptídicos de las proteínas y depende de la orientación espacial que tengan éstos (ver Kelly *et al.*, 2005). Por tanto, a partir de un espectro de dicroísmo circular de una proteína determinada, se pueden conocer los porcentajes aproximados de estructura secundaria de esa proteína.

Dada la naturaleza hidrofóbica de la proteína p1 y la dificultad para obtenerla pura en forma soluble, utilizamos el mutante de delección soluble en medio acuoso (p1ΔC11) para realizar experimentos de dicroísmo circular en el rango de luz

ultravioleta (de 190 a 250 nm de longitud de onda). La Fig. 14 muestra el espectro obtenido para p1ΔC11 a 25 °C y a una concentración de 20 μM. El espectro es una media de 8 análisis realizados en tampón fosfato sódico 25 mM, pH 7,5 con 100 mM de NaCl. Para conocer los tipos de estructura secundaria que subyacen en este espectro, se utilizaron diversos métodos de análisis de espectros con el programa informático DICHROWEB (Whitmore and Wallace, 2004, 2008) (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>), que incluye diversos algoritmos públicos de análisis (ver Materiales y Métodos). De ellos, los que presentaban un error normalizado mayor o igual a 0,1 fueron descartados. La predicción con menor error fue la del algoritmo CONTINLL, con valores de error normalizado entre 0,049 y 0,057, según el conjunto de proteínas de referencia utilizado en el ajuste. Según el algoritmo CONTINLL, la estructura secundaria de la proteína p1ΔC11 estaría compuesta por entre un 21 y un 27% de hélice, entre un 8 y un 18% de cadena y entre un 38 y un 58% de la proteína tendría una estructura secundaria desordenada.

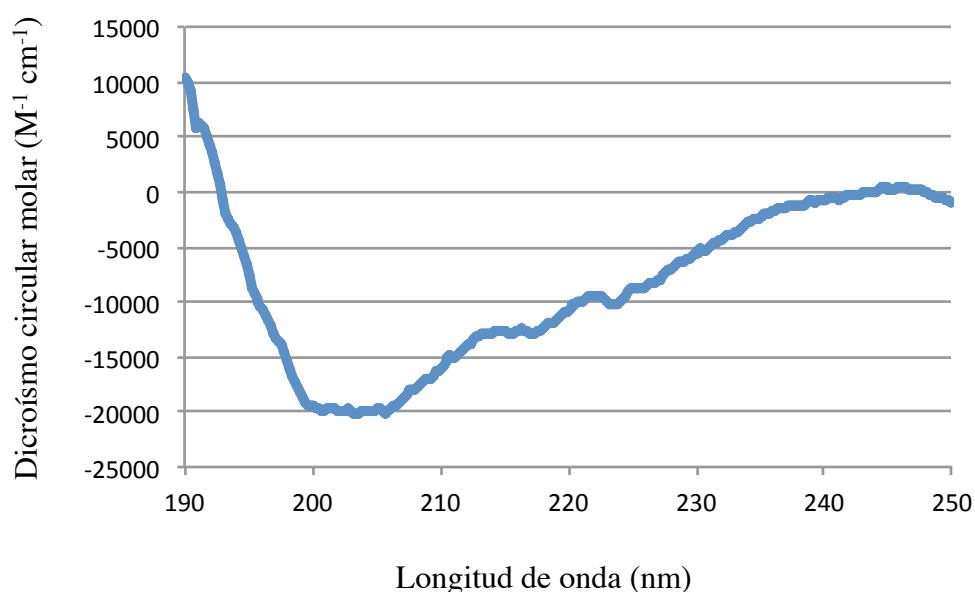
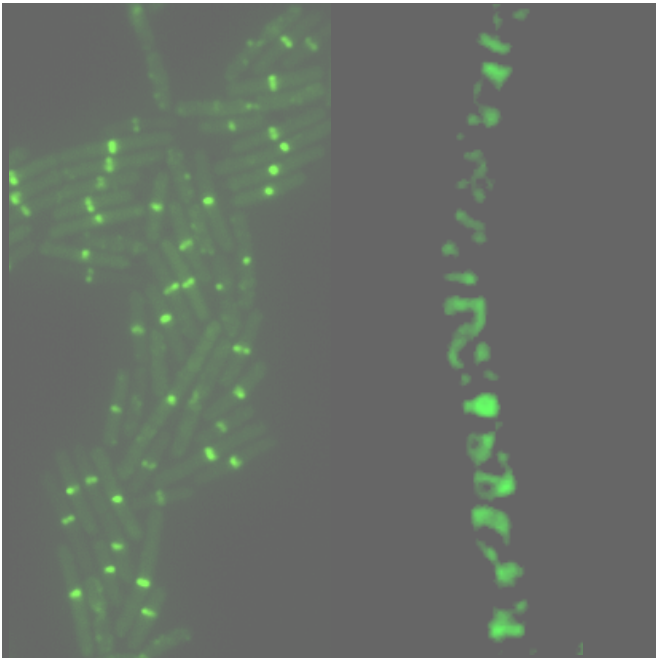


Fig. 14. Espectro de dicroísmo circular de la proteína p1ΔC11. El espectro constituye el promedio de 8 espectros de la proteína p1ΔC11 a concentración de 20 μM en tampón fosfato sódico 25 mM, pH 7,5, que contenía 100 mM de NaCl y que fueron realizados a la temperatura de 25 °C.



Capítulo II

La proteína p1 del fago $\phi 29$
promueve la replicación
del DNA viral
mediante su asociación
con el anillo de FtsZ
del divisoma de *B. subtilis*

La proteína p1 del bacteriófago $\phi 29$ localiza en la parte media de la célula de *B. subtilis* independientemente de otras proteínas codificadas por el fago

Anteriormente se ha determinado una asociación de la proteína p1 con la membrana bacteriana y, mediante inmunomicroscopía electrónica, se observó que la proteína p1 localizaba en la membrana bacteriana o muy cerca de ella (Serrano-Heras *et al.*, 2003). Sin embargo, no se conocía el patrón de distribución de la proteína p1 dentro de la célula de *B. subtilis*.

Como una primera aproximación para determinar la distribución subcelular *in vivo* de la proteína p1 del fago $\phi 29$, se construyó una estirpe de *B. subtilis* (DBP-001) que contiene una fusión del gen *I* del fago $\phi 29$ con el gen *yfp* (*yellow fluorescent protein*). Esta fusión está situada en el locus cromosómico *amyE* y su expresión es inducible por xilosa. La síntesis de la proteína de fusión, YFP-p1, fue analizada mediante *Western-blot* con anticuerpos anti-p1 y anti-GFP (*Green Fluorescent Protein*) y se observó que YFP-p1 estaba presente en los lisados de las células inducidas con xilosa que contenían el gen de fusión *yfp-p1* (Fig. 15). Además, se vio que la proteína YFP-p1 es funcional, ya que complementa la replicación de un fago defectivo en la proteína p1 (Fig. 16).

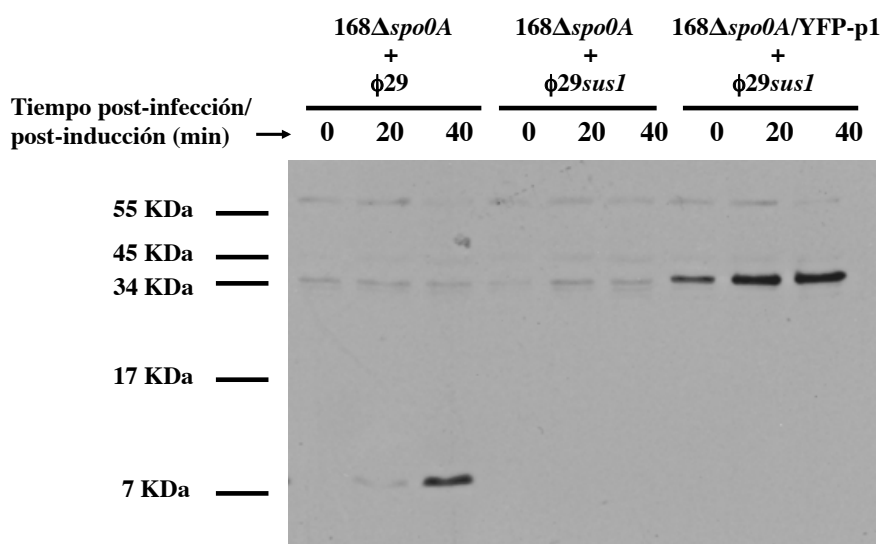


Fig. 15. Síntesis de la proteína p1 (9761 Da) en células de *B. subtilis* 168Δspo0A infectadas con fago $\phi 29$ silvestre, síntesis de p1 en las mismas células infectadas con $\phi 29sus1$ y síntesis de YFP-p1 (~37 KDa) en células DBP-001 (168Δspo0A/YFP-p1) infectadas con $\phi 29sus1$. Se tomaron muestras de cultivo infectado a los tiempos indicados después de la infección y de la inducción y se realizó un *Western-blot* utilizando anticuerpos contra la proteína p1.

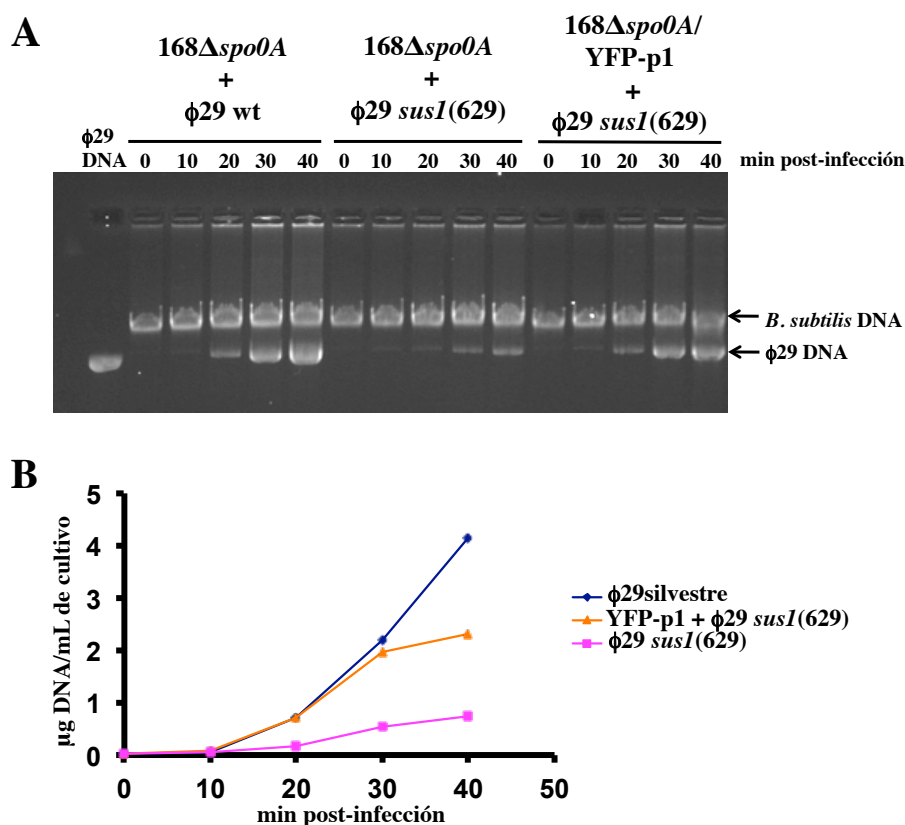


Fig. 16. La proteína YFP-p1 complementa la replicación de un fago ϕ 29 que carece del gen *I*. Se tomaron muestras de cultivo de las estirpes infectadas a los tiempos indicados posteriores a la infección y se analizó el contenido total de DNA intracelular mediante electroforesis en gel de agarosa (A) o mediante reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (B). Se indica mediante flechas la posición del DNA de *B. subtilis* y del DNA viral.

La localización de YFP-p1 fue analizada mediante microscopía de fluorescencia en células de *B. subtilis* que sintetizaban la proteína de fusión y que fueron infectadas con el fago ϕ 29 silvestre. La Figura 17A muestra que, a los 30 minutos de la infección (*i. e.*, en presencia de proteínas codificadas por el fago), YFP-p1 localiza en posiciones centrales de la célula (ver flecha), siguiendo un patrón que recuerda al de la maquinaria de división celular bacteriana. Una vez que el divisoma maduro se ha formado, el crecimiento de la pared celular y de la membrana citoplasmática permite la producción de un septo completo que separa la célula progenitora en dos células hijas, donde permanece asociada YFP-p1 (ver punta de flecha). También se analizó el patrón de distribución de YFP-p1 en ausencia de otras proteínas codificadas por el fago (*i. e.*, en células vivas de *B. subtilis* no infectadas). La Fig. 17B muestra que YFP-p1 está presente en una localización celular media, donde presuntamente se sitúa el divisoma (ver flecha), y en los sitios de constricción (ver puntas de flecha), revelando que su distribución es independiente de otras proteínas codificadas por el fago.

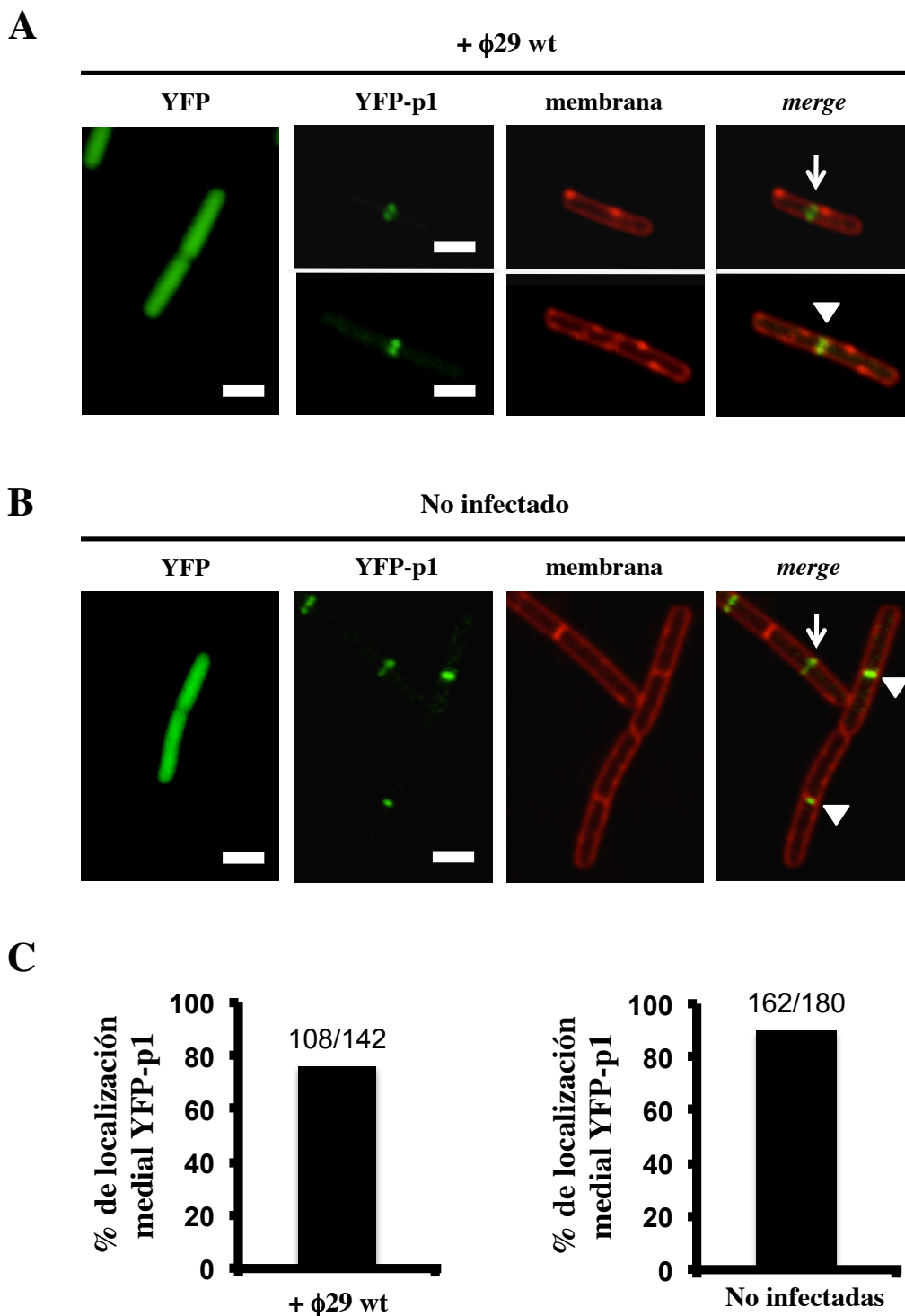


Fig. 17. Localización intracelular de la proteína p1 en células de *B. subtilis*. (A) Imágenes de células de *B. subtilis* que sintetizan la proteína de fusión YFP-p1 inducida por xilosa, tomadas después de la infección con $\phi 29$ a una MOI de 5. Las células fueron fotografiadas 30 min después de la adición de xilosa y del fago $\phi 29$. La combinación de ambas imágenes también se muestra. (B) Imágenes de células de *B. subtilis* no infectadas que expresan la proteína YFP-p1 inducida por xilosa. Las células fueron fotografiadas 30 min después de la adición de xilosa. Para mayor claridad, la señal de YFP está coloreada falsamente en verde y la señal de la membrana bacteriana está coloreada en rojo. La barra de escala indica 2 μ m en todas las imágenes. (C) Cuantificación de las células que presentan señal de YFP-p1 en la mitad celular, representadas en porcentaje, tanto en células infectadas (+ $\phi 29$ wt) como en células sin infectar (No infectadas).

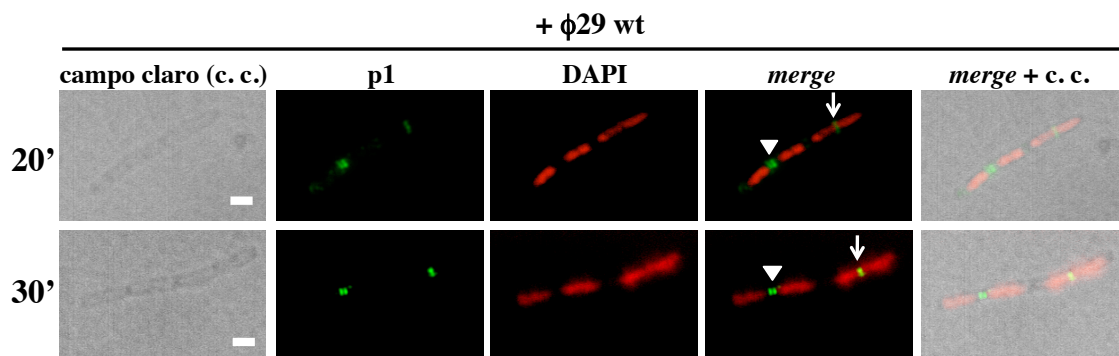


Fig. 18. Células de *B. subtilis* infectadas con $\phi 29$ fueron analizadas mediante inmunofluorescencia (IF) usando anticuerpos contra p1 (verde) 20 minutos y 30 minutos después de la infección. Se muestra el campo claro, la señal de p1, la del DAPI (rojo) y dos combinaciones de ellas. La barra de escala indica 2 μm en todas las imágenes.

Para poder observar el patrón de distribución de la proteína p1 en condiciones fisiológicas, se infectaron células de *B. subtilis* con el fago $\phi 29$ silvestre y se analizó la localización subcelular de la proteína p1 mediante técnicas de inmunofluorescencia (IF) (Fig. 18). En concordancia con los resultados obtenidos con la fusión YFP-p1, se observó que la proteína p1 silvestre localiza en la parte media de la célula, donde el divisoma bacteriano se organiza entre los cromosomas segregados teñidos con DAPI (ver flecha). Al tiempo que la citocinesis tiene lugar, la proteína p1 permanece asociada al sitio de constricción, que será resuelto como un polo de las células hijas (ver puntas de flecha). Estos resultados ponen de manifiesto que la proteína p1 del bacteriófago $\phi 29$ localiza en la parte media de la célula de *B. subtilis* o en futuros sitios de división celular y que esta localización es independiente de otros componentes virales.

La proteína p1 del fago $\phi 29$ colocaliza con la proteína FtsZ de *B. subtilis* independientemente de la presencia de otras proteínas codificadas por el fago

Después de observar la localización de la proteína p1 del bacteriófago $\phi 29$ en células de *B. subtilis*, los resultados indicaban que la proteína p1 podría estar localizando en el lugar en que se va a realizar la división celular y donde, previamente, localiza la maquinaria de división celular o divisoma. Como ya se ha comentado (ver Introducción), la proteína FtsZ es el primer componente que se une a la región celular media para constituir el divisoma. Para determinar si la proteína p1 de $\phi 29$ localiza en el sitio de ensamblaje del divisoma, se construyó una estirpe de *B. subtilis* (DBP-002) que puede expresar simultáneamente las proteínas FtsZ-CFP (FtsZ unida al extremo N-

terminal de la *Cyan Fluorescent Protein*) e YFP-p1 a partir de promotores inducibles por IPTG y xilosa, respectivamente. El análisis por *Western-blot* mostró que, cuando el cultivo fue suplementado con IPTG y xilosa, se detectaban bandas correspondientes al tamaño esperado para FtsZ-CFP e YFP-p1, que reaccionaban con los anticuerpos específicos contra FtsZ y contra p1 (Fig. 19).

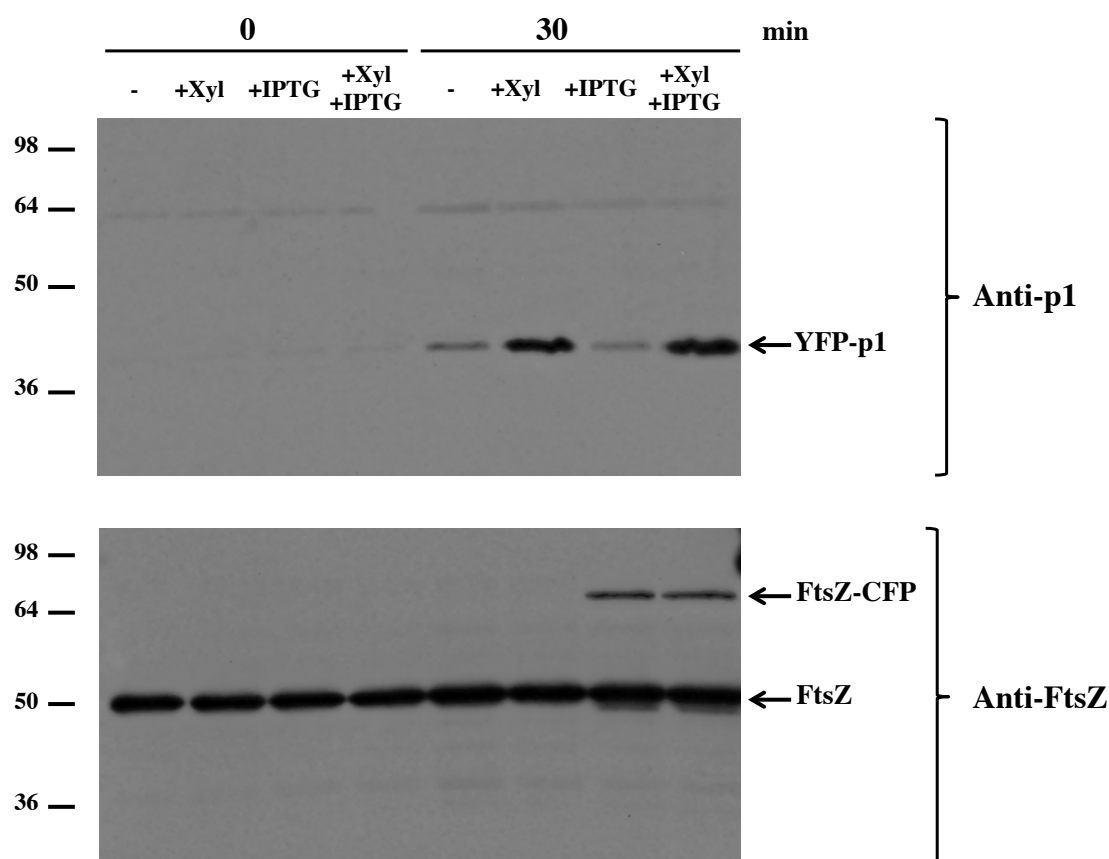
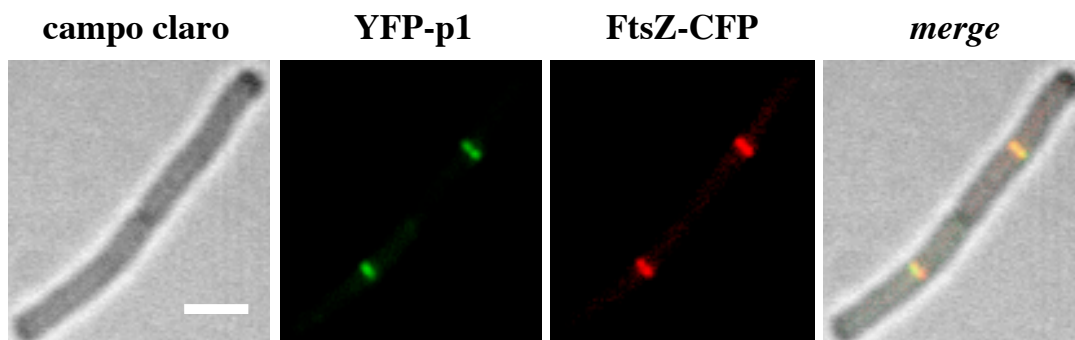


Fig. 19. Síntesis de las proteínas YFP-p1 y FtsZ-CFP en células de *B. subtilis* (estirpe DBP-002). El cultivo de células de *B. subtilis* que contienen las secuencias que codifican las proteínas YFP-p1 y FtsZ-CFP se creció en medio LB a 37 °C hasta fase exponencial (DO_{600} de 0,45). Entonces, se añadió xilosa (+Xyl), IPTG (+IPTG) o xilosa más IPTG (+Xyl +IPTG) para inducir la síntesis de YFP-p1, FtsZ-CFP o YFP-p1 y FtsZ-CFP, respectivamente. A 0 y 30 minutos post-inducción, los lisados celulares totales se analizaron utilizando anticuerpos anti-p1 o anti-FtsZ.

A continuación, se analizó mediante microscopía de fluorescencia la localización celular de las proteínas de fusión FtsZ-CFP e YFP-p1 en células que sintetizaban simultáneamente ambas proteínas. El resultado mostrado en la Fig. 20 reveló que, en células de *B. subtilis* no infectadas y que sintetizan las proteínas FtsZ-CFP e YFP-p1, las señales fluorescentes CFP e YFP siguen un patrón de localización similar en mitad de la célula, y la superposición de ambas señales mostró que las dos

proteínas colocalizan. En conclusión, la proteína p1 del bacteriófago $\phi 29$ localiza en la región de ensamblaje del divisoma en ausencia de otros componentes virales.

A



B

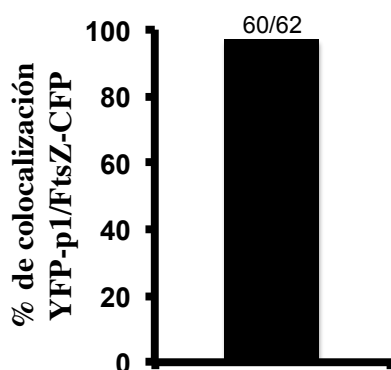


Fig. 20. Colocalización de la proteína p1 y la proteína FtsZ. (A) Imágenes de la localización intracelular de YFP-p1 y FtsZ-CFP en *B. subtilis* 30 minutos después de la inducción de la síntesis de ambas proteínas. Para mayor claridad, la señal de la YFP y de la CFP están falsamente coloreadas en verde y rojo, respectivamente. La imagen final muestra la combinación de las tres imágenes anteriores. La barra de escala indica 2 μ m. (B) Cuantificación de la colocalización entre FtsZ e YFP-p1 representada en porcentaje de células.

La localización de YFP-p1 en la mitad de la célula depende de FtsZ

Dada la colocalización entre FtsZ-CFP e YFP-p1, estudiamos si la proteína p1 dependía de FtsZ para localizar en la región central de la célula, o bien dependía de algún otro componente del divisoma. Para ello, se modificó genéticamente una estirpe de *B. subtilis* que sintetiza FtsZ dependiendo de la presencia de IPTG en el medio (estirpe 1801; Marston *et al.*, 1998). En presencia de IPTG 1 mM, las células sintetizan FtsZ y presentan un fenotipo silvestre. Sin embargo, en ausencia de IPTG, las células son incapaces de sintetizar la proteína FtsZ y muestran un fenotipo filamentoso, consecuencia de un fallo en el inicio de la formación del septo. La estirpe 1801 fue modificada para expresar YFP-p1 de manera dependiente de xilosa, generando la estirpe

DBP-003. Como se observa en la Fig. 21, bajo un entorno silvestre (*i. e.*, cuando FtsZ fue expresada por la adición de IPTG), YFP-p1 localizó en una posición medial en la célula. Sin embargo, en ausencia de FtsZ, las células de *B. subtilis* exhibieron una morfología filamentosa, como consecuencia de un fallo en la formación del septo y la división celular, y la proteína YFP-p1 se distribuyó por toda la célula, algunas veces en combinación con pequeños acúmulos.

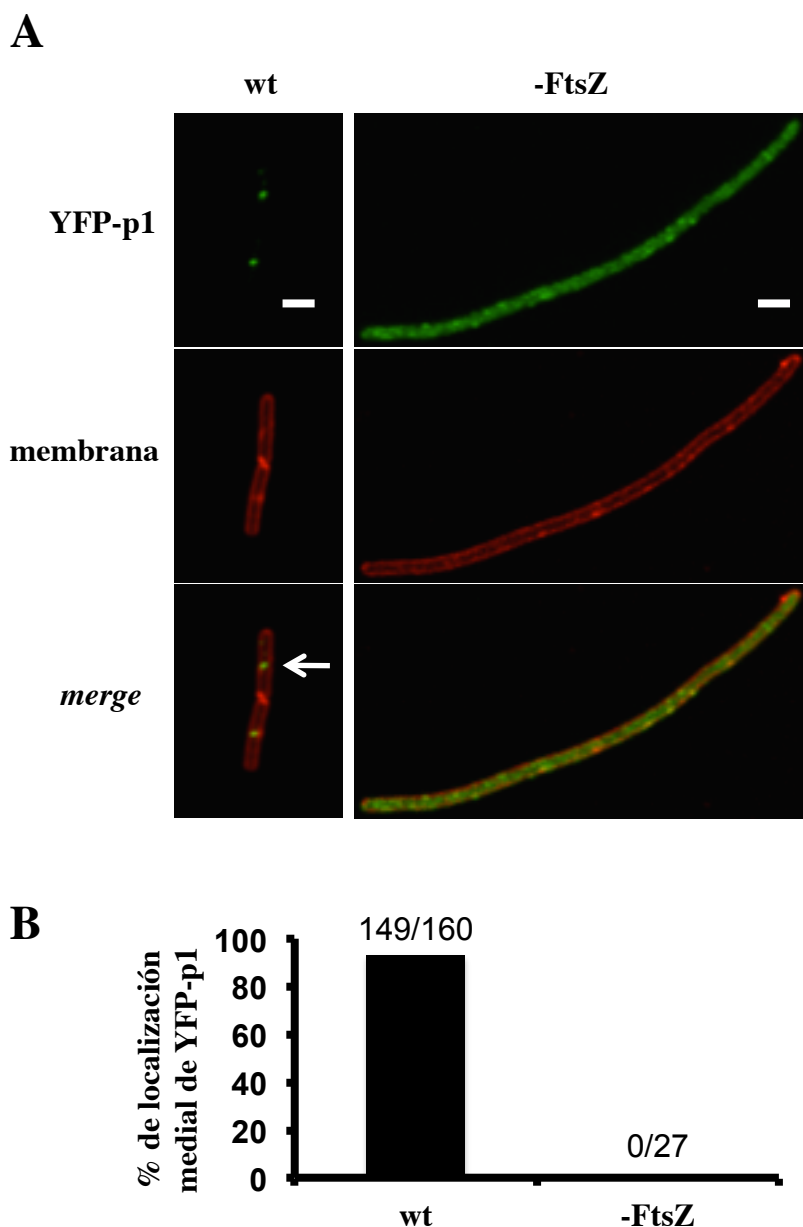


Fig. 21. La ausencia de FtsZ afecta la localización de la proteína YFP-p1. En las imágenes de la columna de la izquierda se puede observar la localización subcelular de la proteína YFP-p1 en un contexto silvestre (wt) en células de *B. subtilis* y en la derecha, su localización en ausencia de la proteína de división celular FtsZ (-FtsZ). Para mayor claridad, la señal de YFP está falsamente coloreada en verde y la señal de membrana, en rojo. La barra de escala indica 2 μ m. (B) Cuantificación de la localización medial de la proteína YFP-p1 en presencia (wt) y ausencia de FtsZ (-FtsZ), expresada en porcentaje de células.

La localización celular de YFP-p1 no depende de la síntesis de la pared del septo

En *B. subtilis* se ha determinado que el ensamblaje de la maquinaria del divisoma ocurre mediante un mecanismo de dos pasos en el cual las proteínas de ensamblaje temprano son directamente reclutadas al anillo Z por la proteína FtsZ y, después de un intervalo de tiempo, son seguidas por la asociación concertada e interdependiente de las proteínas de ensamblaje tardío (Gamba *et al.*, 2009).

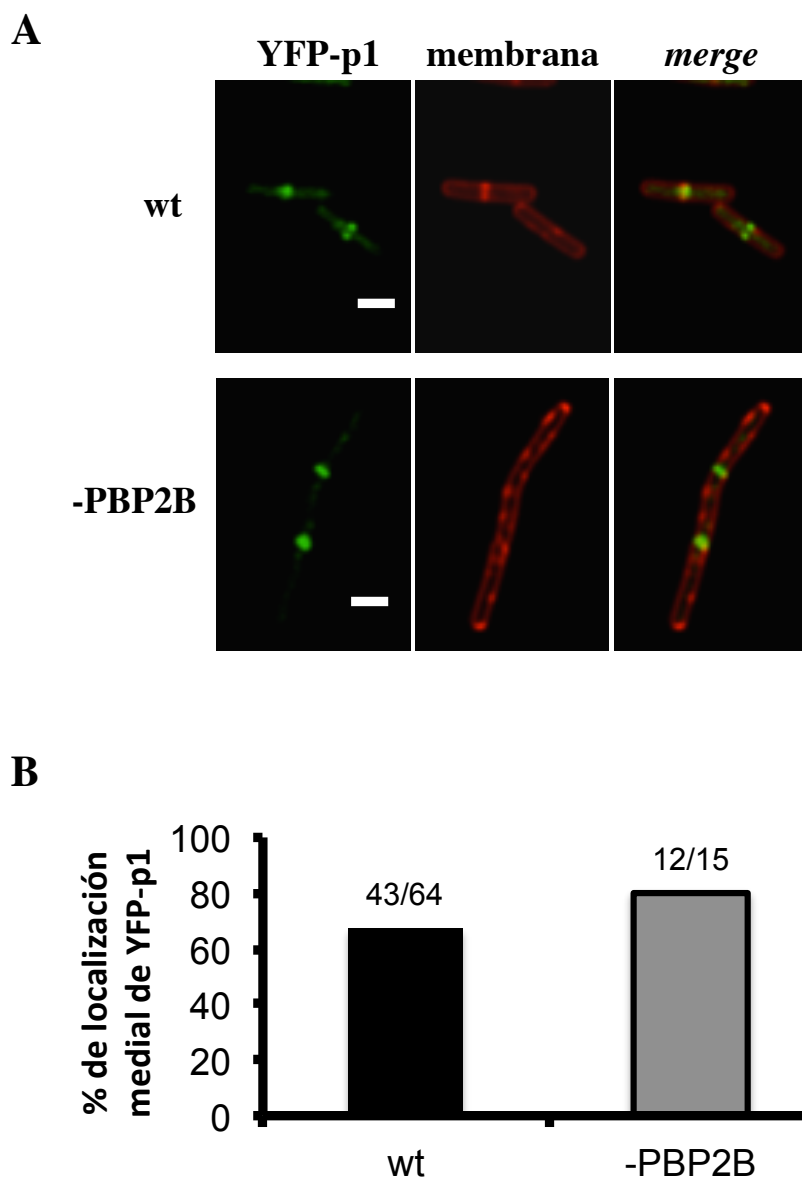


Fig. 22. La localización de YFP-p1 no varía en ausencia de la proteína PBP2B. (A) Imágenes de la localización de YFP-p1 en *B. subtilis* en un contexto silvestre (wt) o en ausencia de la proteína PBP2B (-PBP2B). Para mayor claridad, la señal de membrana está coloreada en rojo y la señal de YFP está falsamente coloreada en verde. La barra de escala indica 2 μ m. (B) Cuantificación de la localización medial de la proteína YFP-p1 en presencia (wt) y ausencia de PBP2B (-PBP2B), expresada en porcentaje de células.

Entre los componentes de ensamblaje tardío, la proteína PBP2B (codificada por el gen *pbpB*) está involucrada en la síntesis del peptidoglicano del septo, y la ausencia de PBP2B bloquea la división celular, provocando la filamentación bacteriana (Daniel *et al.*, 2000). Los resultados anteriores sugieren que el reclutamiento de la proteína p1 al sitio del divisoma ocurre en estadios tempranos de ensamblaje, ya que la proteína p1 fue detectada en una porción de las células donde la membrana citoplasmática no se había invaginado todavía (Fig. 17A, ver flechas). Para determinar si la síntesis de la pared del septo es requerida para el reclutamiento de la proteína p1 a la parte media de la célula, se utilizó la estirpe 804 de *B. subtilis* (Daniel *et al.*, 2000), en la que la expresión del gen *pbpB* está regulada por el promotor inducible por IPTG *Pspac* y fue transformada para que contuviera el gen de fusión *yfp-p1*, inducible por xilosa (estirpe DBP-004). Se ha demostrado que, en ausencia de IPTG (*i. e.*, cuando la síntesis de PBP2B es inhibida), la estirpe 804 exhibe una anómala formación del septo y división celular, incrementándose la longitud celular mientras la proteína FtsZ permanece ensamblada formando bandas posicionadas regularmente a lo largo de la mayoría del filamento celular (Daniel *et al.*, 2000). La Fig. 22 muestra que, en ausencia de PBP2B, YFP-p1 permanece localizando en bandas regulares a lo largo del filamento celular, indicando fuertemente que el reclutamiento de la proteína p1 al sitio de división ocurre antes del ensamblaje de PBP2B y, de esta manera, es independiente de la síntesis de la pared del septo.

La proteína p1 del fago $\phi 29$ y la proteína FtsZ de *B. subtilis* están asociadas en un complejo *in vivo*

El hecho de que la localización subcelular de la proteína p1 dependa de FtsZ, junto con la colocalización observada de ambas proteínas, sugería que la proteína p1 podría estar asociada con el anillo Z, bien directa o indirectamente. Para analizar esta posibilidad, se realizaron ensayos de *pull-down* utilizando una estirpe de *B. subtilis* (168His), que expresa una versión de FtsZ unida a histidina. Los cultivos fueron infectados con el fago $\phi 29$, sometidos a entrecruzamiento químico *in vivo* con formaldehído al 1%, y los complejos con FtsZ fueron purificados utilizando la afinidad de las histidinas por el níquel (ver Materiales y Métodos). Después de electroforesis en

gel de poliacrilamida con SDS, se analizó la presencia de la proteína p1 mediante *Western-blot* con anticuerpos contra esta proteína (Fig. 23). En ausencia de agente de entrecruzamiento químico, se observó la proteína p1 en su forma monomérica en el lisado celular total proveniente de células infectadas que expresaban tanto FtsZ como FtsZ unida a histidinas (carriles 1 y 3), mientras que no se detectó en células no infectadas. Después del entrecruzamiento químico, se detectaron el monómero de la proteína p1, así como oligómeros de proteína p1 en los lisados totales de células infectadas que expresaban tanto FtsZ, como FtsZ unida a histidinas (carriles 7 y 9). Es importante señalar que la proteína p1 fue únicamente detectada en la fracción eluida correspondiente a los complejos purificados de FtsZ unida a histidinas (comparar carriles 4 y 6). Este resultado muestra que FtsZ y p1 están asociadas en un complejo *in vivo*.

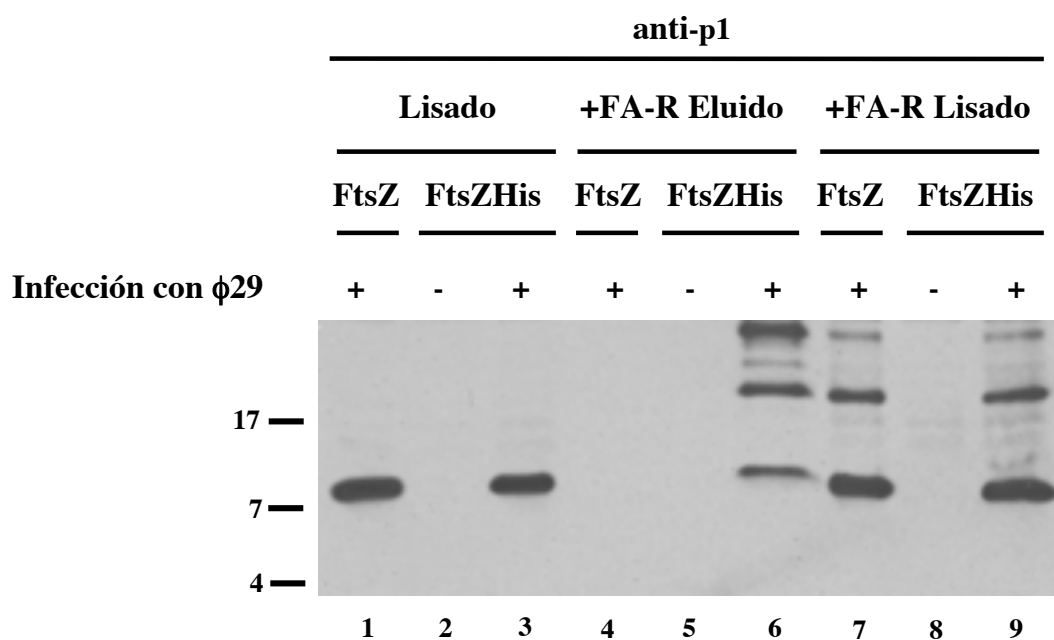


Fig. 23. La proteína p1 está asociada a FtsZ *in vivo*. Células de *B. subtilis* que sintetizan FtsZ silvestre (FtsZ) o FtsZ unida a histidinas (FtsZHis) fueron infectadas con $\phi 29$ *sus14*(1242). Se añadió formaldehído al 1% y se purificaron los complejos que contenían la proteína de fusión FtsZ-His. Como controles, el experimento se realizó en paralelo con células no infectadas y con células que no sintetizan la proteína FtsZ-His. El lisado total (Lisado), el complejo entrecruzado con formaldehído, eluido y revertido (+FA-R Eluido) y el lisado total entrecruzado con formaldehído y revertido (+FA-R Lisado) proveniente de células sin infectar (-) o infectadas con $\phi 29$ *sus14*(1242) (+) fueron analizados mediante *Western-blot*, utilizando anticuerpos contra la proteína p1 (ver Materiales y Métodos).

La proteína FtsZ de *B. subtilis* interacciona con la proteína p1 Δ C11 *in vitro*

Para evaluar si la proteína FtsZ de *B. subtilis* y la proteína p1 de ϕ 29 interaccionan directamente, se realizaron ensayos de entrecruzamiento químico *in vitro*. La proteína p1 tiene una naturaleza hidrofóbica (Serrano-Heras *et al.*, 2003) y su purificación en forma soluble no se ha conseguido hasta ahora. Como se ha mostrado anteriormente, la ausencia de los últimos once aminoácidos de la proteína p1 es suficiente para que esta proteína no se una a la membrana bacteriana y pierda su naturaleza anfifílica.

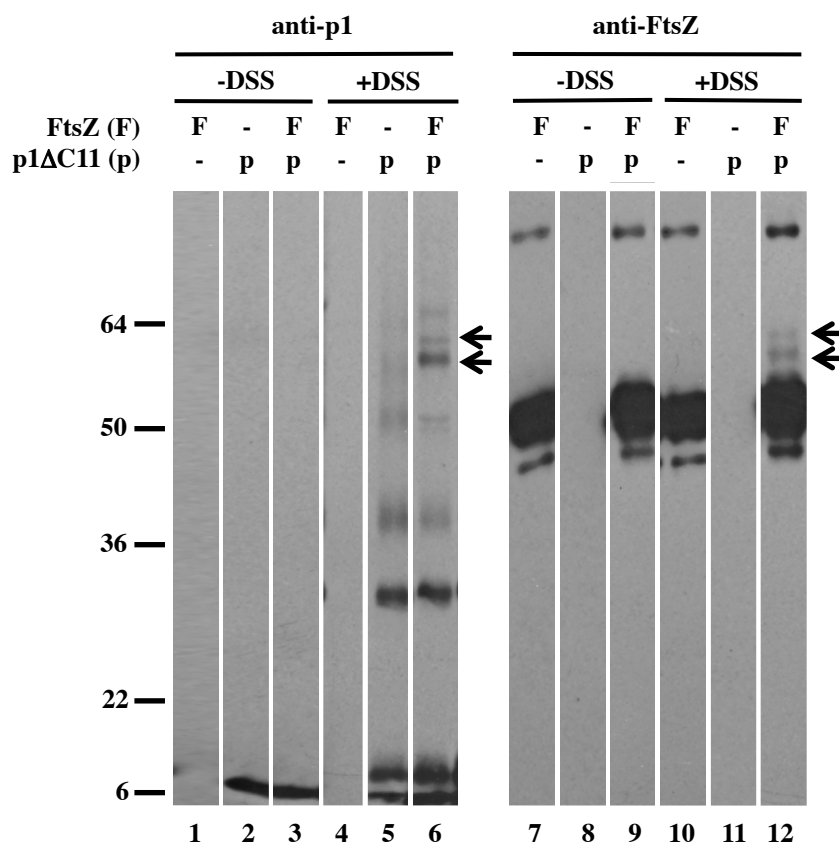


Fig. 24. La proteína p1 Δ C11 interacciona directamente con FtsZ *in vitro*. La proteína p1 Δ C11 purificada (8,8 KDa) fue incubada con la proteína FtsZ de *B. subtilis* (40 KDa) en presencia de 5 mM MgSO₄. A continuación, se añadió GTP a una concentración final de 1 mM y se usó DSS como agente de entrecruzamiento químico (ver Materiales y Métodos). Las muestras del entrecruzamiento se cargaron en gel de poliacrilamida en gradiente del 10 al 20% en presencia de SDS y se analizaron por *Western-blot* utilizando anticuerpos contra p1 y contra FtsZ, como se indica.

Por ello, se deletaron los once residuos C-terminales comprendidos desde la Val75 hasta la Lys85, obteniendo de esta manera una variante soluble de la proteína p1 (p1 Δ C11) (ver Materiales y Métodos). Como agente de entrecruzamiento químico se utilizó DSS (disuccinimidil suberato). El DSS es un agente de entrecruzamiento químico homobifuncional específico para aminas, que contiene un grupo éster N-hidroxisuccinimido amino reactivo a cada lado de un brazo espaciador de ocho carbonos y una longitud de 11,4 Å. Después del tratamiento con DSS, las muestras se cargaron en gel de poliacrilamida en gradiente del 10 al 20% en condiciones desnaturalizantes. Utilizando anticuerpos contra FtsZ y contra p1 se detectaron bandas adicionales cuando las dos proteínas estaban presentes en la mezcla junto con el DSS (Fig. 24, carriles 6 y 12, ver flechas). Estas bandas eran reconocidas tanto por los anticuerpos contra la proteína p1 como por los anticuerpos contra la proteína FtsZ. Además, el tamaño de estas bandas adicionales es el esperado para los complejos FtsZ-p1 Δ C11. Dichos complejos no fueron observados cuando FtsZ o p1 Δ C11 fueron entrecruzados separadamente (carriles 4, 5, 10 y 11). Este resultado indica que FtsZ y la proteína p1 interactúan directamente.

La síntesis de proteína p1 en *B. subtilis* incrementa la longitud celular

A pesar de que la ausencia de la proteína p1 afecta negativamente a la síntesis del DNA de ϕ 29 en células de *B. subtilis* (Bravo and Salas, 1997), se sabía poco de la función biológica de esta proteína. Para profundizar en el papel de la proteína p1 en células vivas, se generó una estirpe de *B. subtilis* capaz de expresar la proteína p1 a partir del promotor *Pspac* inducible por IPTG (estirpe DBP-005), y se analizó la morfología bacteriana mediante el uso de la tinción de membrana FM4-64. Como control, se analizó también la longitud celular en el cultivo sin inducir la síntesis de la proteína p1 y, además, se analizó en paralelo una estirpe que sintetiza CFP bajo el mismo promotor *Pspac* (estirpe DM-024). Mediante *Western-blot* se observó que la cantidad de proteína p1 expresada por la estirpe DBP-005 era similar a la producida en una infección con ϕ 29 (Fig. 25). Como se observa en la Fig. 26A y en la tabla T1A, en ausencia de IPTG, las células bacterianas presentaban un valor medio de 3,78 μ m en longitud celular. De forma similar, las células que sintetizaban CFP, tuvieron un valor

medio de 3,82 μm en longitud celular. Sin embargo, cuando las células sintetizaban la proteína p1, el valor medio de la longitud de estas células fue de 5,55 μm , lo que significa un alargamiento de alrededor de 1,5 veces la longitud bacteriana media. Por otra parte, se analizó también la longitud de células de *B. subtilis* infectadas con el fago $\phi 29$. Para ello, se utilizó el fago $\phi 29_{\text{sus14}}(1242)$, que tiene un fenotipo de lisis retrasado y permite observar la longitud celular a tiempos tardíos de infección viral. Se tomaron muestras del cultivo no infectado y del infectado 50 minutos después de la infección y se midió la longitud celular. En las células no infectadas, el valor medio de longitud celular fue de 3,90 μm , mientras que en células infectadas fue de 5,49 μm (ver Fig. 26B y tabla T1B). Este resultado concuerda con el obtenido en células de *B. subtilis* que sintetizan la proteína p1 en ausencia de otros componentes virales.

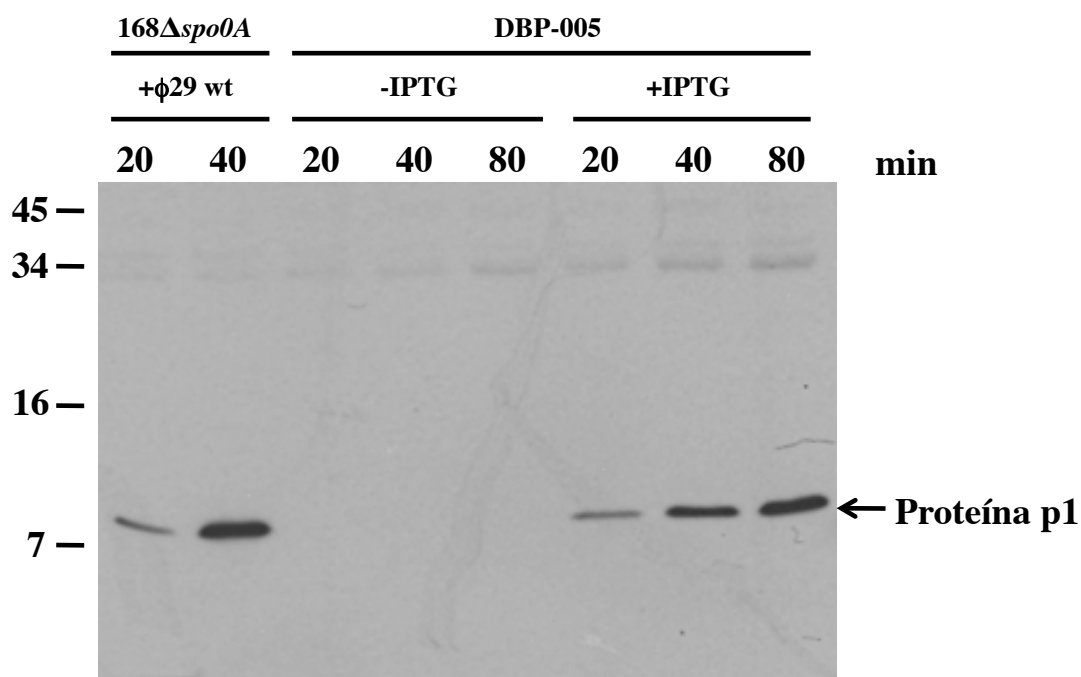


Fig. 25. La proteína p1 sintetizada en la estirpe DBP-005 se produce a niveles parecidos a los de una infección con el fago $\phi 29$. Se analizó por *Western-blot* la síntesis de la proteína p1 en células de *B. subtilis* 168 Δspo0A infectadas con el fago $\phi 29$ y en células de *B. subtilis* que portan el gen *I* bajo un promotor inducible por IPTG (estirpe DBP-005). Se tomaron muestras a los minutos posteriores a la infección o posteriores a la inducción indicados, para comparar la cantidad de proteína p1 producida.

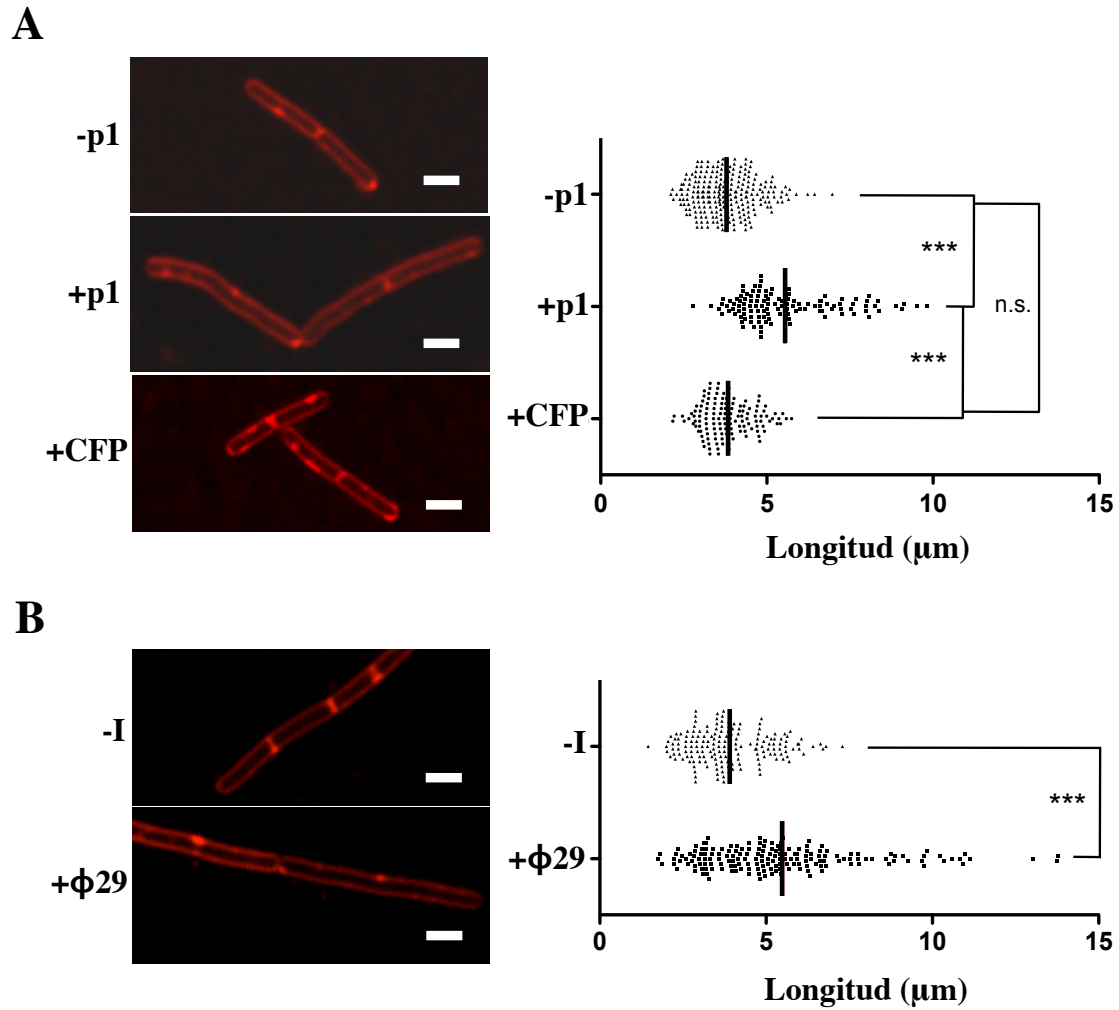


Fig. 26 La síntesis de la proteína p1 incrementa la longitud celular de *B. subtilis*. (A) Células de *B. subtilis* capaces de sintetizar la proteína p1 mediante la adición de IPTG (estirpe DBP-005) fueron crecidas hasta fase exponencial y suplementadas con 1 mM IPTG (concentración final). Después de 45 min (aproximadamente dos generaciones celulares), la membrana de las células fue teñida con FM4-64 y se tomaron fotografías. Como controles internos, a la mitad del cultivo no se le añadió IPTG y también se crecieron en paralelo células de *B. subtilis* que contienen la secuencia que codifica la proteína CFP bajo el mismo promotor, en presencia de IPTG. Las barras de escala indican 2 μm . En la parte derecha se muestra una gráfica con la cuantificación de la longitud celular. La media está marcada como una línea vertical y cada punto en la gráfica representa la medida de longitud de una célula individual (ver Tabla T1A para más detalles). (B) Se crecieron células de la estirpe *B. subtilis* 168 Δspo0A hasta fase exponencial y se infectaron con el fago $\phi 29$ *sus14*(1242). Después de 50 min, las células fueron teñidas con FM4-64 y fotografiadas. Como control, la mitad del cultivo no fue infectado. La gráfica muestra la cuantificación de la longitud celular de las células infectadas y no infectadas (ver Tabla T1B). La longitud celular fue medida con el software Fiji (ImageJ) (ver Materiales y Métodos). La significación estadística fue determinada por un test de Mann-Whitney de dos colas: n.s.-no significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabla T1. Longitud de células que expresan la proteína p1 y de células infectadas con $\phi 29$ *sus14*.**A**

	-p1	+p1	+CFP
Número de valores	242	121	133
Percentil 25 %	3,10	4,52	3,24
Mediana	3,68	5,04	3,72
Percentil 75 %	4,37	6,60	4,36
Media	3,78	5,55	3,82
Desviación típica	0,87	1,47	0,76
Error estándar	0,06	0,13	0,07

B

	No infectadas	+ <i>sus14</i> (1242)
Número de valores	175	175
Percentil 25 %	2,96	3,68
Mediana	3,72	5,05
Percentil 75 %	4,80	6,51
Media	3,90	5,49
Desviación típica	1,16	2,54
Error estándar	0,09	0,19

Tabla T1. Se muestran los valores descriptivos estadísticos de la cuantificación de la longitud de células de *B. subtilis* que sintetizan la proteína p1 en ausencia de otros componentes virales (+p1, Tabla T1A) o durante la infección [+*sus14*(1242), Tabla T1B], con sus respectivos controles. Las longitudes están reflejadas en micrómetros.

La síntesis de DNA viral aumenta con la longitud celular en *B. subtilis*

Teniendo en cuenta que la longitud de células de *B. subtilis* que sintetizan la proteína p1 (ya sea durante la infección viral o en ausencia de otros componentes virales, véase más arriba) es mayor que en células en que no se sintetiza la proteína p1, evaluamos si existe una relación entre la longitud celular y la síntesis de DNA viral. Para ello, se utilizaron las estirpes DBP-006 y DBP-007, la segunda de ellas, mutante de la primera en la proteína EzrA, lo que le confiere un aumento de alrededor de un 45% en la longitud celular (Haeusser *et al.*, 2007). Después de infectar las dos estirpes con el fago $\phi 29$, se analizó la cantidad de DNA viral intracelular a tiempos tardíos de la infección (40 y 50 minutos) mediante PCR a tiempo real. Para poder comparar la

cantidad de DNA viral sintetizado en cada tiempo en una estirpe con respecto a la otra, también se cuantificó mediante PCR a tiempo real la cantidad intracelular de DNA genómico bacteriano y se relativizaron los μg de DNA viral por mL de cultivo frente a los μg de DNA bacteriano por mL de cultivo. De esta manera, se comparó la cantidad de DNA viral en muestras de cultivo que contenían la misma cantidad de DNA bacteriano. Se realizaron siete experimentos en los que se midió la cantidad de DNA intracelular en las dos estirpes y, una vez relativizados los datos, se aplicó el test estadístico “t de Student” para comprobar si había diferencias en la acumulación de DNA viral entre la estirpe mutante (más larga de lo normal) y la estirpe silvestre. Así, determinamos que a los 40 minutos después de la infección se acumula, de media, un 35,1% más de DNA viral en la estirpe larga que en la silvestre, y a los 50 minutos después de la infección se produce una media de un 31% más de DNA viral en la estirpe larga que en la silvestre. Estas diferencias son estadísticamente significativas tanto a los 40 como a los 50 minutos después de la infección (ver Fig. 27). El hecho de que haya más DNA viral en la estirpe mutante que en la silvestre no se debe a una mayor cantidad de DNA viral intracelular inicial, que también fue cuantificado y relativizado (ver Tabla 2). Como control adicional, se comprobó que el número de células infectadas era similar en la estirpe larga y en la estirpe silvestre (ver Tabla T3). Por tanto, cuando se incrementa la longitud celular, se acumula mayor cantidad de DNA viral, lo que podría facilitar una progenie viral mayor.

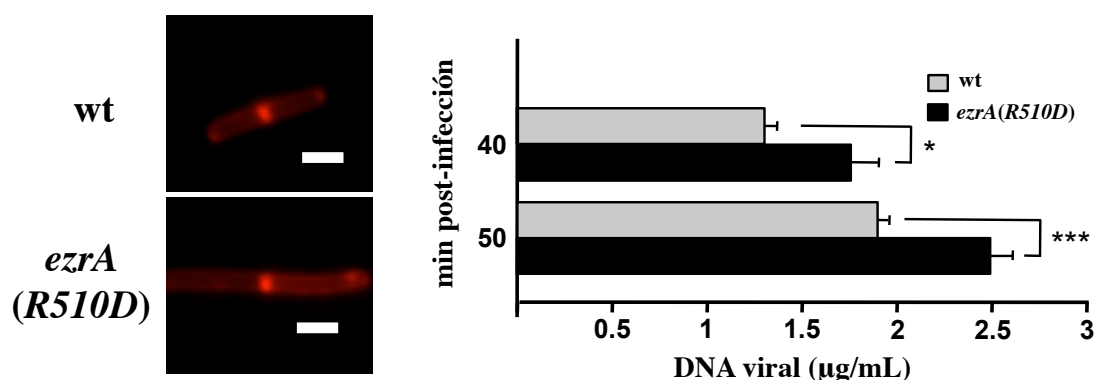


Fig. 27. El alargamiento celular provoca mayor acumulación de DNA viral. La cantidad intracelular de DNA de $\phi 29$ acumulado a 40 y 50 minutos después de la infección en células DBP-006 (silvestre) y DBP-007 (mutante en *EzrA*) se cuantificó mediante PCR a tiempo real. Los datos (μg de DNA viral/mL de cultivo) se normalizaron de acuerdo a la misma cantidad de DNA genómico bacteriano de las estirpes infectadas. La significación estadística de la diferencia de DNA viral acumulado en una estirpe frente a la otra se determinó mediante un test t de Student de dos colas: n.s.-no significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabla T2. DNA viral relativizado acumulado en cada estirpe al tiempo indicado.

Minutos post-infección						
	0		40		50	
Experimento	silvestre	<i>ezrA(R510D)</i>	silvestre	<i>ezrA(R510D)</i>	silvestre	<i>ezrA(R510D)</i>
1	0,0048	0,0034	1,8055	2,5041	2,2607	3,2745
2	0,0034	0,0033	1,6160	3,1810	2,2742	3,3657
3	0,0026	0,0024	1,5443	1,5151	2,0998	2,4785
4	0,0027	0,0024	1,2755	1,5470	1,7355	2,4867
5	0,0025	0,0020	1,0348	1,3176	1,7950	2,1621
6	0,0025	0,0018	0,9315	1,2382	1,6042	1,8636
7	0,0024	0,0021	0,9137	1,0185	1,5642	1,8416
Media	0,0030	0,0025	1,3030	1,7602	1,9048	2,4961
Diferencia en acumulación de DNA viral			35,1%		31,0%	

Tabla T2. La cantidad intracelular de DNA de $\phi 29$ a 0, 40 y 50 min post-infección acumulado en la estirpe DBP-006 (silvestre) y en la estirpe DBP-007 [mutante *ezrA(R510D)*] fue cuantificado mediante PCR a tiempo real cargando triplicados de cada muestra. Los datos (μg de DNA viral/mL de cultivo) fueron obtenidos a partir de siete experimentos y se normalizaron de acuerdo a la misma cantidad de DNA genómico bacteriano en las estirpes infectadas. La diferencia en la acumulación de DNA viral en la estirpe mutante respecto de la estirpe silvestre a los 40 y 50 min post-infección se muestra como porcentaje.

Tabla T3. Células infectadas por mL de cultivo.

Número de células infectadas/mL de cultivo		
Experimento	Estirpe DBP-006 (silvestre)	Estirpe DBP-007 [<i>ezrA(R510D)</i>]
1	$3,4 \times 10^6$	$3,3 \times 10^6$
2	$1,2 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6$
3	$2,9 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$
4	$3,5 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$
5	$2,4 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$
6	$2,7 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$
7	$2,1 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$
Media	$2,6 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$
SEM	$3,0 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$

Tabla T3. La cuantificación del número de células infectadas con $\phi 29$ por mL de cultivo fue realizada inmediatamente después de la infección. Una muestra de las células infectadas fue centrifugada, lavada dos veces para eliminar fagos no adsorbidos y plaqueada en placas de LB con agar de arriba. Se contaron las placas de lisis y el número de unidades formadoras de placa por mL de cultivo en cada estirpe se determinó obteniendo la media de un mínimo de ocho plaques. SEM: error estándar de la media.

La producción de fago está incrementada en células con mayor longitud

Para comprobar si se producen más partículas virales en una estirpe de *B. subtilis* más larga que la estirpe silvestre, se tituló el número de unidades formadoras de placa de lisis (PFUs) por mL de cultivo a tiempo final del ciclo viral (*i. e.*, a los 50 min después de infectar) tanto en células silvestres, como en células mutantes en *EzrA* (un 45% más largas). Para ello, a los 50 min después de comenzar la infección, se tomó una muestra de cada cultivo infectado y se extendió una dilución de esta muestra en placas con agar y células de *B. subtilis* que crecían en fase exponencial. Se contaron las PFUs que había en cada placa y se multiplicaron por el factor de dilución para conocer cuántas había por mL de cultivo. El experimento se repitió siete veces y se hicieron duplicados para contar el número de PFUs. Como control, se partió del mismo número de células infectadas de cada estirpe (ver Tabla T3). La media de PFUs/mL de cultivo en la estirpe silvestre (wt) fue de $5,45 \times 10^9$, mientras que la media obtenida en la estirpe mutante (*EzrA*) fue de $7,42 \times 10^9$ PFUs/mL cultivo, lo que supone un incremento de alrededor de un 36% más de PFUs en la estirpe larga, respecto de la estirpe silvestre. Esta diferencia de medias es estadísticamente significativa con un test t de Student emparejado de dos colas (Fig. 28).

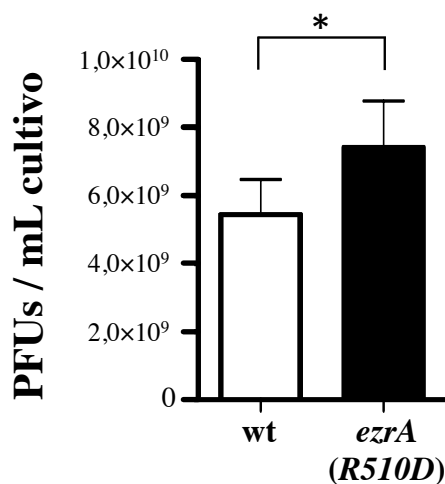
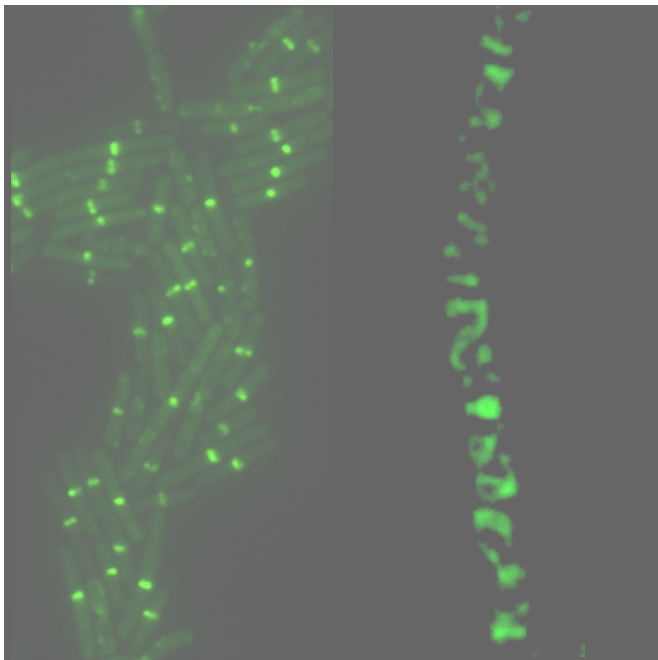


Fig. 28. La producción de unidades formadoras de placa de lisis es mayor en células de mayor longitud. Se tituló el número de unidades formadoras de placa de lisis (PFUs) por mL de cultivo a los 50 min después de la infección de células de *B. subtilis* de longitud normal (wt) y de longitud incrementada (*ezrA*). El experimento se realizó siete veces y las medias están representadas en la figura por el límite superior de cada rectángulo ($5,45 \times 10^9$ para wt y $7,42 \times 10^9$ para *ezrA*). La barra superior indica el error estándar de la media. La significación estadística de la diferencia de PFUs/mL en una estirpe frente a la otra se determinó mediante un test t de Student emparejado de dos colas: n.s.-no significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



Capítulo III

La proteína p17
del bacteriófago $\phi 29$:
Organización subcelular
e interacción
con otras proteínas

La proteína p1 interacciona con la proteína p17

Se ha descrito que la proteína p1 y la proteína p17 del fago $\phi 29$ ayudan a la unión eficiente de la proteína p6 al DNA viral *in vivo*, ya que en los fagos mutantes $\phi 29$ *susI*(629) y $\phi 29$ *susI7*(112) que no sintetizan, respectivamente, la proteína p1 y la proteína p17, la unión de la proteína p6 al DNA viral está significativamente disminuida respecto a la unión de p6 al DNA del fago silvestre (González-Huici *et al.*, 2004a). Para estudiar si la proteína p1 podría interaccionar con la proteína p17, se utilizó un sistema de doble híbrido en bacteria (Karimova *et al.*, 1998).

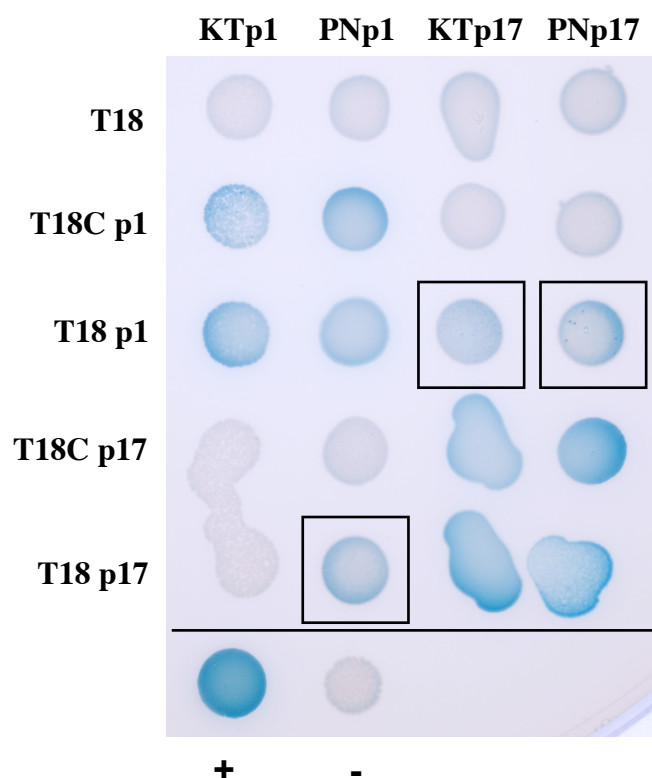


Fig. 29. La proteína p1 y la proteína p17 interaccionan en el ensayo de doble híbrido en bacteria. Se clonaron las secuencias que codifican la proteína p1 y la proteína p17 en fase antes o después del fragmento T18 y del fragmento T25 de la adenilato ciclase. Las interacciones positivas aparecen en color azul.

Para ello, se clonaron las secuencias que codifican las proteínas p1 y p17 junto con las secuencias que codifican los fragmentos T18 y T25 de la adenilato ciclase, se co-transformaron células de *E. coli* y se comprobó si había interacción entre alguna de las proteínas de fusión generadas. Cuando hay interacción entre las proteínas analizadas, los fragmentos T18 y T25 de la adenilato ciclase se asocian y posibilitan que el ATP sea

transformado a cAMP. El cAMP se une a la proteína activadora de catabolito (CAP) y el complejo cAMP/CAP activa la expresión de varios genes, incluyendo los genes del operón *lac*. Esto posibilita que el X-Gal sea transformado y se observa un precipitado de color azul en las colonias en las que las proteínas interaccionan. Como se puede observar en la Fig. 29, hay evidencia de interacción entre la proteína p1 y la proteína p17. Como controles de interacciones descritas, también se observaron las interacciones oligoméricas entre p1 y p1 o entre p17 y p17.

La proteína p17 del bacteriófago ϕ 29 localiza formando hélices en células de *B. subtilis*

Mediante experimentos de inmunofluorescencia se ha determinado la localización intracelular de la proteína p17 del bacteriófago ϕ 29 en células infectadas.

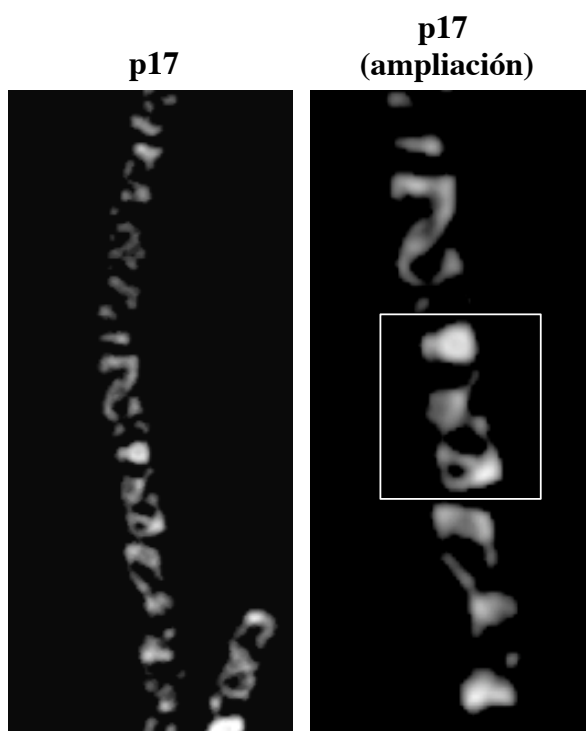


Fig. 30. La proteína p17 del bacteriófago ϕ 29 localiza siguiendo un patrón helicoidal en células de *B. subtilis*. A los 30 min después de la infección se tomaron muestras de células infectadas y fueron analizadas mediante técnicas de inmunofluorescencia. Se utilizaron anticuerpos contra la proteína p17 de ϕ 29 y anticuerpos secundarios unidos al fluorocromo Alexa488.

Para ello, se crecieron células de *B. subtilis* en medio LB hasta fase exponencial y se les añadió el fago ϕ 29 $_{sus14}$ (1242) para que tuviera lugar la infección viral. A los 30 minutos después de la infección se recogieron muestras de las células infectadas, se

fijaron con formaldehído y glutaraldehído y se procesaron para inmunofluorescencia (ver Materiales y Métodos). Para visualizar la localización de la proteína p17 se utilizaron anticuerpos contra dicha proteína y anticuerpos secundarios conjugados con el fluorocromo Alexa488. Como muestra la Fig. 30, a los 30 minutos después de la infección, la proteína p17 se encuentra formando hélices en el interior de la célula bacteriana. En concreto, hay entre una y dos vueltas de hélice de la proteína p17 en el interior de cada célula (ver recuadro en la Fig. 30)

La proteína p17 colocaliza parcialmente con la proteína p16.7 en *B. subtilis*

Como ya se ha mencionado, la proteína p17 está implicada en la inyección del genoma de $\phi 29$ en el interior de la célula de *B. subtilis* (González-Huici *et al.*, 2004b). Otra proteína que está implicada en esta etapa es la proteína p16.7, que es requerida para que se internalice totalmente el DNA de $\phi 29$ a tiempos iniciales post-infección (entre 0 y 15 min). Si la proteína p16.7 no está presente, la inyección total del genoma viral se retrasa, al menos hasta el minuto 30 post-infección (Alcorlo *et al.*, 2007). Ya que tanto la proteína p17, como la proteína p16.7 están implicadas en la inyección del DNA viral, ambas proteínas podrían tener una localización intracelular similar. Para comprobar esta hipótesis, se estudió la localización de la proteína p16.7 junto con la localización de la proteína p17 mediante inmunofluorescencia en células infectadas. Las muestras se procesaron como se describe en Materiales y Métodos. Para visualizar la localización de la proteína p17, se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con Alexa488 y, en el caso de la proteína p16.7, se usó un anticuerpo secundario conjugado con Alexa647. Como se puede observar en la Fig. 31, la proteína p16.7 forma estructuras de tipo helicoidal en células de *B. subtilis*, de forma parecida a las que forma

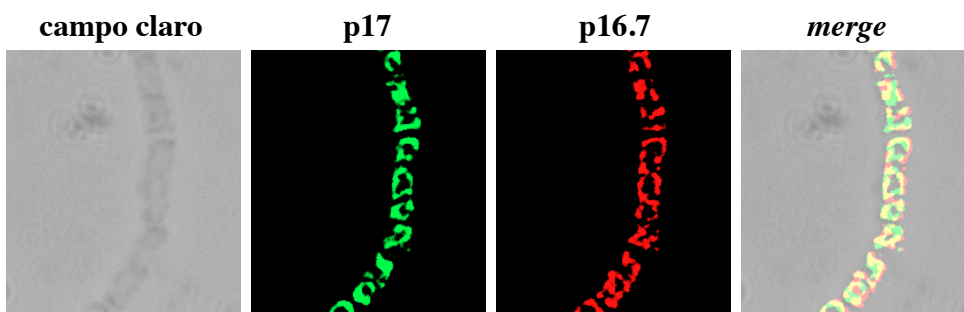


Fig. 31. Colocalización parcial de p17 y p16.7 en células de *B. subtilis*. En las imágenes se muestra, de izquierda a derecha, el campo claro, la localización en células de *B. subtilis* de la proteína p17 de $\phi 29$, la localización de la proteína p16.7 de $\phi 29$ y la superposición de la señal de localización de estas dos proteínas con el campo claro (*merge*).

la proteína p17. La superposición de la señal de la p16.7 con la señal de la p17 muestra que ambas proteínas se distribuyen de manera similar a lo largo de la célula y que colocalizan parcialmente. Esto sugiere que estas dos proteínas podrían estar interaccionando.

La proteína p17 interacciona *in vitro* con la proteína p16.7

Para comprobar si existe una interacción entre la proteína p17 y la proteína p16.7, se realizaron experimentos de entrecruzamiento químico *in vitro* con el agente DSS y las proteínas p17 y p16.7 purificadas. Como se observa en la Fig. 32, cuando se encuentran presentes las dos proteínas (p17 y p16.7) y se ha añadido DSS como agente de entrecruzamiento químico, aparecen dos bandas proteicas adicionales (carril 5), que podrían ser complejos de p17 unida a p16.7 (ver flechas). Como control, estas bandas no aparecen cuando sólo p17 está en la mezcla de reacción, cuando sólo está p16.7, o cuando están ambas pero no se ha añadido el agente de entrecruzamiento químico DSS. Este resultado sugiere que las proteínas p17 y p16.7 interaccionan directamente.

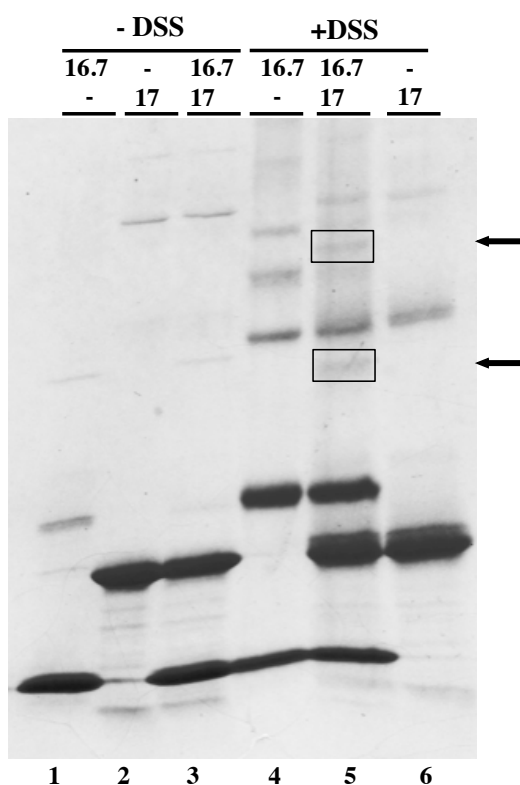


Fig. 32. La proteína p17 interacciona con la proteína p16.7 *in vitro*. Las proteínas p17 (17 en la figura) y p16.7 (16.7 en la figura) fueron purificadas e incubadas *in vitro* en presencia o ausencia del agente de entrecruzamiento DSS. Después de la incubación, las muestras se cargaron en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y se observó la aparición de dos bandas adicionales (carril 5, ver cuadros) cuando se incuban juntas p17 y p16.7 y se añade el agente de entrecruzamiento.

La proteína p17 forma hélices en ausencia de p16.7, MreB, Mbl o MreBH

Dada la colocalización parcial de las proteínas p17 y p16.7 y su interacción detectada por entrecruzamiento químico *in vitro*, la proteína p16.7 podría influir en la localización de la proteína p17 en células de *B. subtilis* y, por lo tanto, resulta interesante analizar la localización de la proteína p17 en ausencia de la proteína p16.7. Para ello, se utilizó el fago mutante doble $\phi 29$ *susI6.7(48)/susI4(1242)*, que es incapaz de sintetizar la proteína p16.7 y la proteína p14 en un contexto celular silvestre. Como se hizo anteriormente, se analizó la localización de la proteína p17 mediante inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos primarios contra la proteína p17 y anticuerpos secundarios conjugados con Alexa488. Como se puede observar en la Figura 33, las células infectadas con el fago $\phi 29$ *susI6.7(48)/susI4(1242)*, muestran una localización de la proteína p17 formando hélices en el interior celular, de la misma manera que ocurre en células infectadas con $\phi 29$ silvestre y que sintetizan la proteína p16.7. Por tanto, la localización helicoidal de p17 no depende de la expresión de la proteína p16.7.

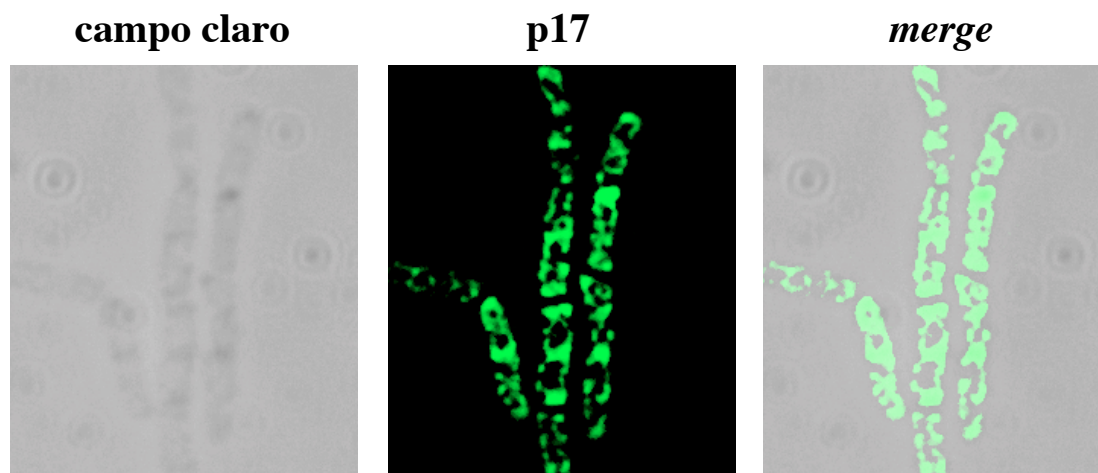


Fig. 33. Localización de la proteína p17 del fago $\phi 29$ en células infectadas en ausencia de la proteína p16.7. En las imágenes se muestra, de izquierda a derecha, el campo claro, la localización de la proteína p17 visualizada mediante técnicas de inmunofluorescencia y la combinación de las dos primeras imágenes (*merge*).

Se sabe que la proteína p16.7 localiza siguiendo un patrón helicoidal en células de *B. subtilis* y esta distribución subcelular requiere un citoesqueleto intacto compuesto por las proteínas MreB, Mbl y MreBH, que también siguen una distribución helicoidal y

que colocan con p16.7 (Muñoz-Espín *et al.*, 2009). Se han utilizado mutantes de *B. subtilis* incapaces de sintetizar la proteína MreB, la proteína Mbl o la proteína MreBH, para estudiar cómo localiza la proteína p17 en ausencia de estos componentes del citoesqueleto bacteriano. Como muestra la Fig. 34, en ausencia de MreB la proteína p17 localiza formando hélices. Esta localización es la misma en células que carecen de la proteína Mbl o en células que carecen de la proteína MreBH (Fig. 34). En conclusión, la localización intracelular de la proteína p17 formando estructuras helicoidales, es independiente de la presencia de la proteína viral p16.7 y también de las proteínas del citoesqueleto bacteriano MreB, Mbl o MreBH.

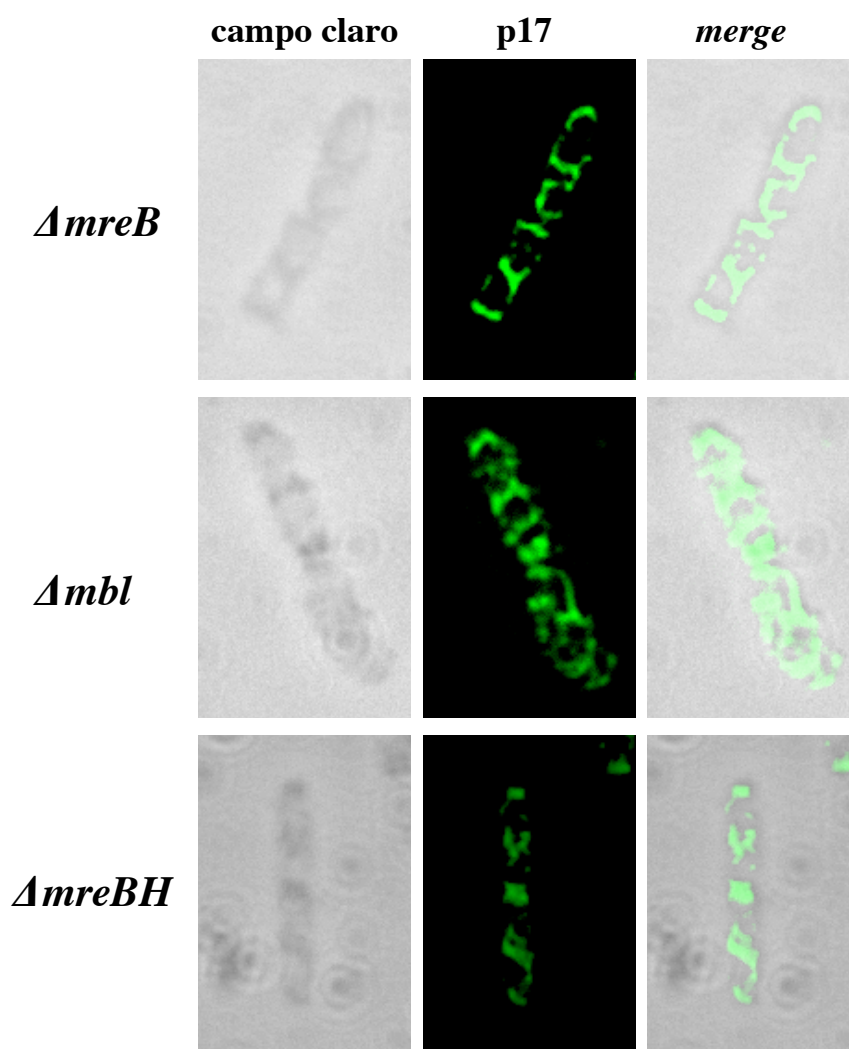


Fig. 34. La proteína p17 del fago ϕ 29 mantiene su localización helicoidal en células de *B. subtilis* en ausencia de las proteínas del citoesqueleto MreB, Mbl o MreBH. Células de *B. subtilis* que no sintetizan las proteínas MreB, Mbl o MreBH ($\Delta mreB$, Δmbl y $\Delta mreBH$, respectivamente) fueron crecidas, infectadas con el fago ϕ 29 y sometidas a técnicas de inmunofluorescencia con anticuerpos contra la proteína p17. Las imágenes muestran, de izquierda a derecha, el campo claro, la localización de la p17 (verde) y la combinación de las dos primeras imágenes (*merge*).

La proteína p17 de $\phi 29$ localiza formando un patrón helicoidal en ausencia de otros componentes virales en células de *B. subtilis*

Para observar la localización de la proteína p17 de $\phi 29$ en ausencia de otros componentes virales, se clonó el gen que codifica esta proteína en un vector de integración en el cromosoma de *B. subtilis* cuyo promotor está regulado por IPTG. Se crecieron las células de *B. subtilis* que habían integrado el gen y la síntesis de la proteína p17 se indujo mediante la adición de IPTG.

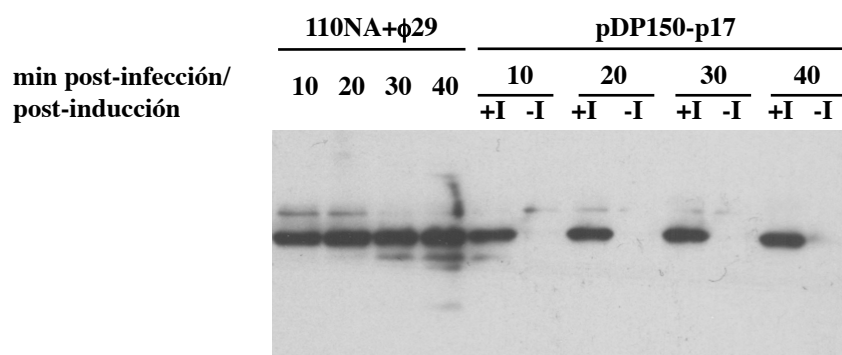


Fig. 35. Síntesis de la proteína p17 a partir de infección viral y a partir del gen *p17* clonado en *B. subtilis*. A la izquierda, se muestra la síntesis de la proteína p17 a partir de células 110NA infectadas con el fago $\phi 29$ a los distintos tiempos post-infección. A la derecha, inducción de la proteína p17 en células no infectadas, a diferentes tiempos después de la inducción. +I: células inducidas, -I: células no inducidas.

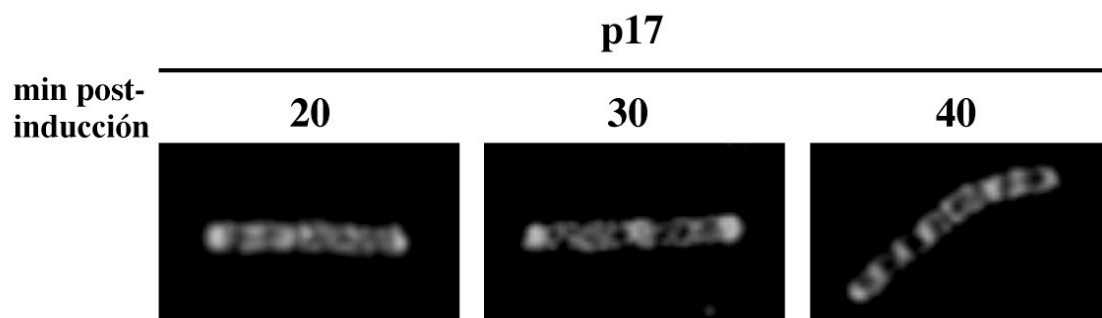
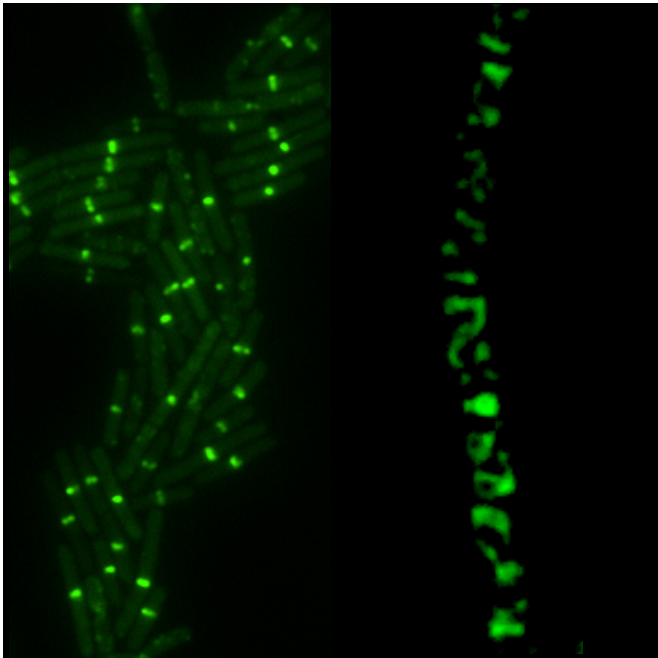


Fig. 36. Localización de la proteína p17 del bacteriófago $\phi 29$ en ausencia de otros componentes virales. Se crecieron células de *B. subtilis* y se indujo la síntesis de la proteína p17. A los 20, 30 ó 40 minutos después de la inducción (indicado en la figura), se fijaron las células y se analizaron mediante inmunofluorescencia para detectar la proteína p17.

Como se puede observar en la Figura 35, la proteína p17 se sintetizó con un tamaño correcto y a niveles similares a los obtenidos durante el transcurso de la infección. Las células que sintetizaban la proteína p17 fueron fijadas a los 20, 30 y 40 minutos después de la inducción y se sometieron a técnicas de inmunofluorescencia. La localización de la proteína p17 se analizó utilizando anticuerpos primarios contra la proteína p17 y anticuerpos secundarios conjugados con Alexa488. Se pudo observar que la proteína p17 localiza en células de *B. subtilis* siguiendo un patrón helicoidal (Fig. 36). Esta localización es la misma que se observaba en células infectadas y demuestra que la proteína p17 de $\phi 29$ no necesita otros componentes virales para localizar formando un patrón de tipo helicoidal en células de *B. subtilis*.



Discusión

El bacteriófago $\phi 29$ es un buen organismo modelo para diversos procesos en biología molecular. En particular, la replicación del DNA de este virus se ha estudiado extensamente, y se conocen muchos detalles acerca de cómo tiene lugar (Salas, 1991, 1999). Sin embargo, mucho de lo que se conoce está basado en estudios *in vitro* y al inicio de la presente tesis existían algunos vacíos de conocimiento sobre el ciclo de $\phi 29$ *in vivo* y sobre la forma en que se replica su material genético. ¿Cómo se organiza el genoma del fago durante la replicación de su DNA?, ¿qué patrón o patrones de localización siguen las proteínas codificadas por el fago cuando tiene lugar el ciclo viral y la replicación del DNA? o ¿cuál es el papel de ciertas proteínas, como la proteína p1, en la replicación del DNA de $\phi 29$ *in vivo*? son algunas de las preguntas que quedaban sin responder todavía.

Durante su ciclo infectivo, los bacteriófagos son capaces de producir grandes cantidades de progenie viral en un corto espacio de tiempo. Para ello, y debido al reducido tamaño de sus genomas, los fagos utilizan algunas funciones celulares y estructuras del hospedador para su propio beneficio. En este sentido, la replicación del DNA del fago debe estar eficientemente organizada para permitir la amplificación simultánea de múltiples genomas virales en un corto espacio de tiempo. En el caso del bacteriófago $\phi 29$, el ciclo lítico se completa en aproximadamente 50 minutos, generando hasta 1.000 partículas de fago por cada célula infectada de *B. subtilis*, y se ha demostrado que $\phi 29$ se aprovecha de algunos componentes celulares durante la replicación del DNA viral, como el citoesqueleto bacteriano, el nucleoide y la membrana citoplasmática (Bravo and Salas, 1997; Ivarie and Pene, 1973; Muñoz-Espín *et al.*, 2009, 2010, 2012). En concordancia con la producción de tan elevadas cantidades de progenie viral, el número de proteínas de replicación de $\phi 29$ que son sintetizadas en la célula infectada es muy alto. Por ejemplo, la cantidad de DNA polimerasa viral aumenta hasta 1.000 moléculas por célula durante el ciclo infectivo, y la TP hasta 10.000 moléculas por célula (Bravo and Salas, 1997). Se ha determinado que la concentración intracelular de la proteína p1 aumenta a lo largo del ciclo infectivo, alcanzando niveles alrededor de 60 veces más altos que los de la DNA polimerasa viral (Bravo and Salas, 1997).

Los resultados de esta tesis, junto con los obtenidos previamente, nos permiten proponer un modelo sobre el papel biológico de la proteína p1 durante la replicación del DNA del fago $\phi 29$ en células infectadas de *B. subtilis* (Fig. 37).

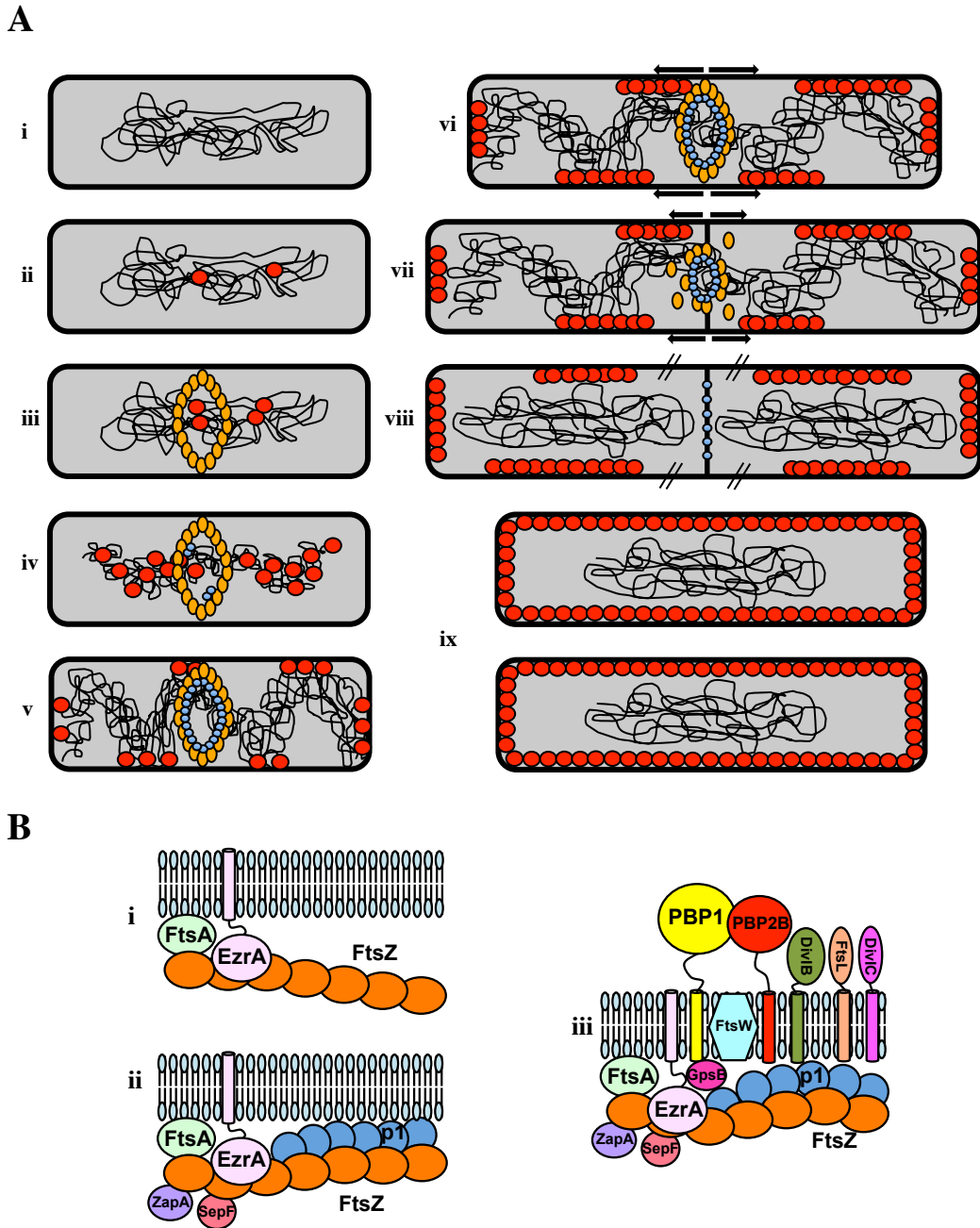


Fig. 37. Modelo del papel biológico de la proteína p1 durante la infección del fago $\phi 29$. (A, i) Una vez que la inyección del TP-DNA de $\phi 29$ (círculos rojos) tiene lugar, éste es reclutado al nucleóide bacteriano (A, ii). Mientras la replicación del DNA de $\phi 29$ procede en el cromosoma bacteriano, FtsZ forma una estructura anular (óvalos naranjas) en el futuro sitio de división (A, iii), y la proteína p1 (círculos azules) se asocia con el anillo Z (A, iv y v). La replicación del DNA del fago $\phi 29$ se distribuye hacia la membrana bacteriana a la par que el DNA bacteriano de nueva síntesis se segrega hacia los polos en estructuras helicoidales y, después de la elongación celular, se produce la formación del septo, que es seguida de la constricción celular y el desensamblaje de los componentes del divisoma (A, v-vii). La proteína p1 permanece asociada a los futuros polos de las células hija alargadas, que presentan una superficie de membrana mayor para compartimentalizar el proceso de replicación del DNA (A, viii y ix). (B) El ensamblaje de la maquinaria de división ocurre en dos etapas en *B. subtilis*. Las proteínas de ensamblaje temprano son reclutadas al anillo Z directamente por FtsZ (B, i y ii) y la proteína p1 interacciona con los filamentos de FtsZ (B, ii). Las proteínas de ensamblaje tardío: FtsL, FtsW, DivIB, DivIC y PBP2B se asocian al complejo del divisoma y se produce la formación del septo transversal de división (B, iii). Las proteínas, el DNA viral, el nucleóide bacteriano y la membrana no están dibujadas a escala.

Después de que tenga lugar la inyección del TP-DNA, el genoma viral es reclutado al nucleoide bacteriano (Fig. 37A, *ii*) mediante el dominio de unión a DNA de la TP parental. El nucleoide bacteriano constituye un ambiente apropiado para la replicación y la transcripción del fago $\phi 29$, ya que contiene altas concentraciones de deoxi- y ribonucleótidos y también por el hecho de que el fago necesita usar la RNA polimerasa de *B. subtilis*, la cual se ha demostrado que está localizada en el nucleoide bacteriano (Lewis *et al.*, 2000). El operón temprano localizado en el extremo izquierdo del genoma de $\phi 29$ codifica la proteína p1 y componentes esenciales de la maquinaria de replicación del DNA de $\phi 29$ (Salas, 1991). Cuando ésta se localiza en el nucleoide bacteriano, el genoma viral comienza a ser replicado y, al tiempo que comienza la división celular, el ensamblaje del anillo Z (Fig. 37A, *iii* y B, *i*) sirve como armazón para el reclutamiento de la proteína p1 (Fig. 37A, *iv* y *v*). Durante el reclutamiento de otras proteínas de división de ensamblaje temprano por medio de FtsZ, la proteína p1 multimeriza formando protofilamentos bidimensionales y se organiza como una estructura en mitad de la célula (Fig. 37B, *ii*). Los resultados sugieren una asociación temprana de la proteína p1 con el anillo Z, que sería seguida por el reclutamiento de proteínas de ensamblaje tardío, involucradas en la formación del septo: FtsL, FtsW, DivIB, DivIC y PBP2B (Fig. 37B, *iii*). Esta asociación temprana se basa en que la localización de la proteína p1 no está alterada en células que no sintetizan PBP2B y, por tanto, es independiente de la síntesis de la pared del septo. Además, la proteína p1 se sintetiza desde el inicio del ciclo infeccioso del fago $\phi 29$ (Bravo and Salas, 1997) y posee la capacidad de asociarse con FtsZ directamente. A tiempos medios después de la infección, la maquinaria de replicación del DNA del fago $\phi 29$ se distribuye siguiendo una localización helicoidal a lo largo de la membrana celular a la par que el DNA bacteriano de nueva síntesis se transloca hacia los polos (Fig. 37A, *v*) (Muñoz-Espín *et al.*, 2009). A pesar de que se propuso inicialmente que la proteína p1 tendría un papel en la organización de la replicación del DNA de $\phi 29$ en la membrana bacteriana (Bravo *et al.*, 2000), esta posibilidad parece improbable, debido al hecho de que la proteína p1 localiza en el lugar del divisoma durante el ciclo de infección viral. De hecho, se ha demostrado que en los últimos estadios de la replicación del DNA viral, la proteína de membrana p16.7 de $\phi 29$ es la responsable de asociar el DNA del fago a sitios periféricos, mediante la interacción con el citoesqueleto bacteriano de MreB, que

además se asocia con la membrana celular por toda la longitud bacteriana (Muñoz-Espín *et al.*, 2009).

El crecimiento y la división de bacterias con forma bacilar, tales como *B. subtilis*, requiere de un cambio coordinado y secuencial entre dos modos de crecimiento que probablemente compiten entre sí (Margolin, 2009). En células en crecimiento, el peptidoglicano se sintetiza por toda la pared celular en sentido longitudinal, lo que resulta en la elongación bacteriana (Fig. 37A, vi). Al tiempo que se produce la división celular, la maquinaria de síntesis de peptidoglicano cambia de longitudinal a la formación de un septo transversal, a lo que sigue la constricción celular y el desensamblaje de los componentes del divisoma (Fig. 37A, vii). En esta tesis, se ha determinado que las células de *B. subtilis* que sintetizan la proteína p1 poseen una longitud celular incrementada. La proteína p1 podría retrasar la formación del septo y/o el desensamblaje del divisoma en sus partes elementales y, de esta manera, la maquinaria de síntesis insertaría moléculas de peptidoglicano lateralmente por un periodo más largo antes de la división celular, resultando células hijas con una longitud incrementada (Fig. 37A, vii-ix). Debido a que la membrana bacteriana constituye el sitio donde la maquinaria de replicación del DNA de $\phi 29$ es finalmente redistribuida, su expansión por una división celular retrasada causada por la asociación de la proteína p1 con el divisoma bacteriano proporcionaría una estrategia viral para optimizar la producción de grandes cantidades de DNA viral. De acuerdo con esto, la acumulación intracelular de DNA de $\phi 29$ se vio afectada significativamente cuando células de *B. subtilis* fueron infectadas con un fago mutante en el gen *I* (Bravo and Salas, 1997), y la producción del DNA viral se vio incrementada en una estirpe con mayor longitud que la estirpe silvestre.

Recientemente se ha descrito que la proteína Gp0.4 del bacteriófago T7, que infecta a la bacteria Gram negativa *E. coli*, incrementa la longitud de las células en las que está presente (Kiro *et al.*, 2013), al igual que ocurre con las células de *B. subtilis* que sintetizan la proteína p1. Este alargamiento celular conferido por Gp0.4 en *E. coli* está producido por una inhibición de la función de la proteína FtsZ y confiere una ventaja competitiva respecto a los fagos que no sintetizan la proteína Gp0.4. En concreto, se ha demostrado que Gp0.4 inhibe el ensamblaje de filamentos de FtsZ *in vitro* y que mutantes espontáneos insensibles a la toxicidad de Gp0.4 presentan una mutación en FtsZ (FtsZ9). Además, células que sintetizan la proteína FtsZ9 no

presentan apenas incremento en la longitud celular cuando sintetizan la proteína Gp0.4, como sí ocurre en células que sintetizan FtsZ silvestre y la proteína Gp0.4. Finalmente, se demuestra que la presencia de Gp0.4 aumenta la cantidad de fago producido, respecto a la ausencia de Gp0.4. Estos resultados están de acuerdo con los resultados obtenidos con la proteína p1 del bacteriófago $\phi 29$ y muestran que la estrategia de unión a FtsZ y el alargamiento celular para producir mayor progenie viral podría estar ampliamente extendida, pues se ha demostrado en especies tan distantes como la bacteria Gram negativa *E. coli* y la bacteria Gram positiva *B. subtilis*.

Durante el transcurso de esta tesis, se ha determinado que la proteína p1 del bacteriófago $\phi 29$ aumenta la longitud de las células de *B. subtilis* y que las células con mayor longitud celular acumulan más DNA del fago $\phi 29$. Sin embargo, se desconoce de qué manera actúa la proteína p1 para aumentar la longitud celular. Dado que la proteína p1 se asocia con el divisoma, parece claro que esta proteína tendría una función antagónica del divisoma, desestabilizándolo de alguna manera. La interacción *in vitro* entre la proteína p1 y FtsZ apunta a pensar que la acción antagónica de p1 sobre el divisoma recaería en una inhibición o una ralentización de la polimerización de FtsZ durante la formación del anillo Z. Además, también se ha visto que la proteína p1 requiere de FtsZ para localizar en el sitio de división *in vivo*, por lo que parece clara la asociación entre ambas proteínas. A pesar de ello, se desconoce cuál sería el mecanismo de acción de la proteína p1 para retrasar la formación del anillo de FtsZ. Se sabe que la proteína FtsA es necesaria para un ensamblaje eficiente del anillo Z en mitad de la célula de *B. subtilis* y que FtsA se asocia con FtsZ de forma independiente a la presencia del anillo Z (Jensen *et al.*, 2005). Así, la proteína p1 podría competir con FtsA por la unión de FtsZ. De esta manera, las moléculas de FtsZ que fueran secuestradas por la proteína p1, no se unirían a FtsA y se ralentizaría la formación del anillo Z, provocando una división celular retrasada. Mientras la división celular no se produce, la célula sigue elongándose para generar futuras células hijas y entonces la célula, todavía sin dividir, presenta mayor longitud que las células que no sintetizan p1, pues estas últimas se dividen a un ritmo normal.

Actualmente existe evidencia de que los virus eucarióticos han desarrollado la capacidad de hacer uso de los componentes citoesqueléticos de actina y tubulina. Paradójicamente, mientras la citocinesis bacteriana está organizada por el homólogo de tubulina FtsZ, el anillo contráctil eucariótico está formado por actina. Por otro lado,

mientras el citoesqueleto bacteriano está organizado por el homólogo de actina MreB, las células eucarióticas dependen de los microtúbulos de tubulina. Se sabe que algunos virus eucarióticos afectan al curso normal de la citocinesis. Por ejemplo, la proteína de la nucleocápsida del coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo inhibe la citocinesis y la proliferación celular mediante la interacción con el factor humano de elongación de la traducción 1 α (EF1 α) (Zhou *et al.*, 2008), y la proteína replicasa P90 del virus *Rubella*, que interacciona con la proteína reguladora de citocinesis Citron-K quinasa, causa detención en el ciclo celular y aberraciones cromosómicas (Atreya *et al.*, 2004). Después de infectar a la célula eucariótica, el transporte basado en el citoesqueleto provee a numerosos virus de los medios para alcanzar el lugar de replicación (normalmente el núcleo) y genera la ruta para que la progenie recién ensamblada abandone la célula infectada. Además de la actina, muchos virus son capaces de usar la red de microtúbulos como vías para mover sus componentes a través del denso citoplasma (Taylor *et al.*, 2011). Los adenovirus, que replican sus genomas de forma similar a ϕ 29, mediante un mecanismo de proteína cebadora, mueven sus cápsidas de forma dependiente a microtúbulos para llegar al núcleo celular, por lo que son capaces de utilizar homólogos eucarióticos de la proteína bacteriana FtsZ (Suomalainen *et al.*, 1999).

Recientemente se ha descrito que ciertos bacteriófagos utilizan proteínas relacionadas con la tubulina y con FtsZ para una segregación correcta de su DNA. Aunque de forma diferente al fago ϕ 29, estos fagos hacen uso de proteínas del tipo tubulina/FtsZ para aumentar la eficiencia en la replicación o el mantenimiento de sus genomas a lo largo del tiempo. De hecho, codifican su propia proteína que es homóloga a tubulina y/o a FtsZ. El bacteriófago c-st de *Clostridium botulinum* porta en su genoma una secuencia que da lugar a la proteína CST189, que es del tipo tubulina/FtsZ y que se ha clasificado como TubZ (Oliva *et al.*, 2012), una familia de proteínas relacionadas con tubulina, pero también con FtsZ, que se descubrieron anteriormente y que están implicadas en la segregación de ciertos plásmidos en *Bacillus anthracis* y *Bacillus thuringiensis* (Larsen *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2006; Tinsley and Khan, 2006). La proteína de la familia TubZ codificada por el fago c-st de *C. botulinum* ensambla en filamentos dobles helicoidales que unen e hidrolizan GTP y, junto con las proteínas TubR y TubY, también codificadas en el genoma del bacteriófago, constituiría un sistema de segregación del genoma del fago. Recientemente se ha resuelto la estructura

tridimensional de la proteína TubZ del fago ϕ KZ de *Pseudomonas*. Esta proteína muestra un plegamiento del tipo tubulina/FtsZ con un sitio GTPasa y forma protofilamentos canónicos (Aylett *et al.*, 2013). Por otro lado, el bacteriófago 201 ϕ 2-1, que infecta a la bacteria *Pseudomonas chlororaphis*, codifica una proteína homóloga a tubulina y FtsZ, que ha sido denominada PhuZ (Kraemer *et al.*, 2012). Esta proteína ensambla un análogo al huso mitótico de las células eucariotas, que actuaría en la segregación del genoma recién replicado.

Además de los ejemplos citados en fagos, se conocen casos de bacterias que codifican sus propias proteínas de la familia tubulina/FtsZ. Como ya se ha comentado, ciertos plásmidos de *B. anthracis* y *B. thuringiensis* codifican su propia proteína TubZ, pero además existen bacterias que codifican un tipo diferente de tubulina. En un número limitado de especies del género *Prostheobacter* existen las proteínas BtubA y BtubB, que tienen más similitud con la tubulina eucariótica α y β , que con FtsZ o TubZ (Jenkins *et al.*, 2002). Estas proteínas de *Prostheobacter* forman microtúbulos compuestos sólo por 5 protofilamentos, que podrían ser homólogos ancestrales de los microtúbulos eucariotas compuestos por 13 protofilamentos (Pilhofer *et al.*, 2011). Estos hallazgos de proteínas tipo tubulina (FtsZ, TubZ, PhuZ, BtubA/B), unidos al conocimiento que ya se tenía sobre las estructuras formadas por homólogos procariotas de proteínas eucariotas tipo actina (MamK, ParM, Alf, MreB, FtsA) o tipo filamentos intermedios (CreS, Ccrps), demuestran que, lejos de tener un interior celular desorganizado, las células procariotas constan de un citoesqueleto interno complejo capaz de organizar procesos vitales (para una revisión reciente, ver Celler *et al.*, 2013; Pilhofer and Jensen, 2013). Como se ha comentado anteriormente, este citoesqueleto bacteriano sirve al bacteriófago ϕ 29 para organizar la replicación de su genoma en la membrana, por medio de las proteínas de la familia MreB (MreB, Mbl y MreBH) y la proteína viral p16.7 y, por otra parte, el fago ϕ 29 es capaz de secuestrar la región del citoesqueleto configurada por el anillo Z, mediante la asociación de la proteína p1 a la proteína bacteriana FtsZ y al divisoma. Por tanto, el citoesqueleto bacteriano aparece como un componente fundamental en la replicación del DNA del bacteriófago ϕ 29 *in vivo*, ya sea por la capacidad de distribución de los genomas recién replicados o bien con el objetivo de retrasar la división celular.

Papel de la región C-terminal de la proteína p1 en la asociación a la membrana bacteriana

Como ya se ha comentado, la proteína p1 se une a la proteína bacteriana FtsZ y además se podría estabilizar esta unión asociándose a la membrana lipídica. De acuerdo con esto, se determinó con anterioridad que las láminas de protofilamentos formadas por la proteína p1 poseen la capacidad de asociarse a la membrana bacteriana (Serrano-Heras *et al.*, 2003). Durante el desarrollo de esta tesis se ha intentado identificar la región de la proteína p1 responsable de esta asociación. Mediante mutantes de delección se ha establecido que al deleccionar cinco aminoácidos del extremo C-terminal, la proteína resultante mantiene su asociación con la membrana bacteriana y su naturaleza anfifílica, así como la capacidad de complementar la replicación del fago $\phi 29$ *susI*(629). Sin embargo, al deleccionar once aminoácidos del extremo C-terminal de la proteína p1, se pierde la asociación con la membrana bacteriana y la naturaleza anfifílica. Por tanto, la delección de alguno o algunos de los aminoácidos comprendidos entre el sexto y el undécimo aminoácido del extremo C-terminal de la proteína p1 es importante para su asociación con la membrana y su naturaleza anfifílica. Como se ha comentado, entre estos seis aminoácidos de la proteína p1 se encuentra una secuencia de cuatro aminoácidos que está totalmente conservada en fagos relacionados con $\phi 29$ (ver Fig. 9), el segmento VLFG. Los resultados indican fuertemente que este segmento sea el responsable de la asociación de la proteína p1 a la bicapa lipídica, pues cuando se deleciona esta secuencia junto con los dos aminoácidos que la flanquean, se pierde la asociación a la membrana bacteriana y la naturaleza anfifílica de p1.

Una clase minoritaria de proteínas de membrana son las proteínas ancladas por el extremo C-terminal ("*C-tail anchored proteins*" o proteínas TA) (Kutay *et al.*, 1993), a la que pertenecen, entre otras proteínas, el citocromo b_5 , el antígeno T mediano del virus polio, Bcl-2 y la sinaptobrevina o la subunidad TssL del sistema de secreción de tipo IV de *E. coli*. Estas proteínas se unen a la membrana de manera post-traducciona, mediante un segmento transmembrana C-terminal y no utilizan el complejo Sec61 ni la partícula de reconocimiento de señal (SRP) que son requeridos en la inserción co-traducciona de las proteínas en la membrana (Kutay *et al.*, 1995). Se ha descrito que la especificidad de la unión a la membrana parece estar configurada en las características físico-químicas del segmento señal más que en la secuencia aminoacídica

de dicho segmento (Halbach *et al.*, 2006). El segmento transmembrana de las proteínas TA está flanqueado en ambos extremos por cortas secuencias que suelen contener residuos cargados (Wattenberg and Lithgow, 2001). Precisamente el residuo 75 de la proteína p1 es una lisina, que es un residuo con carga, y seguidamente aparecen residuos hidrofóbicos que terminan con otra lisina en la posición 85. La supresión de esta secuencia de residuos hidrofóbicos, flanqueada por residuos no hidrofóbicos, resulta en la no asociación de la p1 a la membrana bacteriana. De esta manera, parece que estos residuos facilitarían la unión de la proteína p1 a la membrana. Cabe especular con la posibilidad de que la proteína p1 sea una “*C-tail anchored protein*” que se asocia con FtsZ para ralentizar la formación del divisoma y así conferir una mayor superficie en la membrana celular para compartimentalizar los genomas de $\phi 29$ de nueva síntesis en la célula procariota. La proteína p1 se asociaría con la membrana y, de esta manera, se estabilizaría la unión con FtsZ.

En el desarrollo de esta tesis, se ha intentado tener una aproximación a la estructura secundaria de la proteína p1 Δ C11 y se han realizado con ella experimentos de dicroísmo circular. Como se puede observar en el apartado Resultados, la proteína p1 Δ C11 presenta una estructura desordenada, abarcando entre el 38 y el 58% de su secuencia. Existe una clase de proteínas que están intrínsecamente desordenadas estructuralmente (IDPs) (Dunker *et al.*, 2001) o bien que contienen regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs) de, al menos, 20-30 residuos de longitud. Estas proteínas realizan su función con estos segmentos desordenados y precisamente gracias al desorden en su estructura les confiere determinadas características de movilidad. Se sabe ahora que las IDPs y las IDRs son muy comunes en la naturaleza y están abundantemente involucradas en numerosos procesos biológicos (Dunker *et al.*, 2000; Ward *et al.*, 2004; Wright and Dyson, 1999; Xue *et al.*, 2012). Entre las funciones que realizan las IDRs, se encontrarían las relacionadas con las interacciones con otras moléculas, las derivadas de su actividad entrópica y las funciones de tipo chaperona (Uversky, 2013). La capacidad de los virus para controlar diversas rutas y procesos dentro de la célula hospedadora es bien conocida. Una de las estrategias utilizadas por ciertas proteínas virales es la mimetización de motivos lineales cortos (SLiMs) de proteínas del hospedador (Davey *et al.*, 2011). Los motivos SLiM son secuencias aminoacídicas cortas desestructuradas, que forman superficies de interacción funcional, localizadas en IDRs. Estos motivos sirven al hospedador para regular determinadas

funciones celulares, de las que se apropiará el virus para desarrollar su ciclo vital. El virus simplemente tendría que mimetizar las SLiMs del hospedador, lo que puede ser relativamente sencillo, pues las secuencias son cortas. Resulta tentativo especular que la proteína p1 tuviera alguna SLiM en su secuencia, pues como se ha podido comprobar mediante dicroísmo circular, la proteína p1ΔC11 presenta una o más regiones con estructura desordenada. Si éste fuera el caso, la proteína p1 podría actuar mimetizando alguna SLiM de alguna proteína del divisoma de *B. subtilis*. Recientemente se ha determinado que la región que une el dominio globular N-terminal con el dominio C-terminal de la proteína FtsZ de *B. subtilis* actúa como una IDR (Buske and Levin, 2013) y que ocurre lo mismo en la proteína FtsZ de *E. coli* (Gardner *et al.*, 2013). De hecho, ambas regiones son intercambiables. Esta región de unión entre el dominio N-terminal y la región C-terminal de la proteína FtsZ podría ser mimetizada por la proteína p1 como si fuera una SLiM y, de esta manera, la proteína p1 se podría unir a FtsZ, ralentizando su ensamblaje y la formación del anillo Z. Así, la proteína p1 podría interaccionar con la SLiM de FtsZ, haciendo que la SLiM de la molécula de FtsZ no tuviera la suficiente movilidad o estructura determinada como para que el monómero de FtsZ pudiera unirse con otro monómero de FtsZ y ensamblar de manera eficiente el anillo Z. De cualquier forma, el efecto inhibitorio que la proteína p1 tiene sobre FtsZ y la formación del anillo Z no parece ser total, sino más bien algo atenuado, pues se ha visto que las células que sintetizan p1 presentan alrededor de un 50% más de longitud celular. Si hubiese una inhibición total de la formación del anillo Z, sería esperable células más largas que un 50% en las condiciones experimentales probadas (alrededor de dos generaciones). Así, el bacteriófago φ29 optimizaría los recursos del hospedador en su propio beneficio para la obtención de una mayor progenie.

Papel biológico de la proteína p17

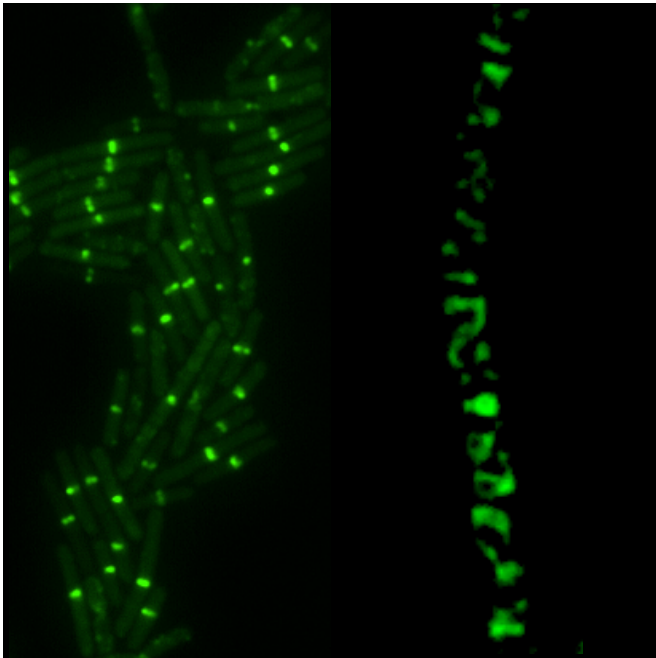
Los resultados obtenidos en cuanto a la localización subcelular de la proteína p17 del fago φ29 y a la interacción de esta proteína con la proteína p16.7 del mismo organismo, sugieren un papel adicional de la proteína p17, además del ya conocido en la inyección del DNA viral dentro de la célula de *B. subtilis*. Como se ha podido ver, la proteína p17 de φ29 localiza siguiendo un patrón helicoidal en células de *B. subtilis*, de

manera similar a como lo hace la proteína p16.7. Esta distribución de p17 es independiente de otros componentes virales, ya que ocurre en células que sintetizan la proteína codificada en *trans* a partir de un plásmido insertado en el genoma bacteriano, en ausencia de infección viral. Además, la localización de la proteína p17, a diferencia de la de la proteína p16.7, no depende de los componentes citoesqueléticos MreB, Mbl, ni MreBH. Por otra parte, según el resultado de entrecruzamiento químico *in vitro*, la proteína p17 podría interaccionar directamente con la proteína p16.7. El papel biológico adicional que podría presentar la proteína p17 sería el de estabilizar la asociación en la membrana y la asociación con el citoesqueleto bacteriano de la proteína 16.7. Como consecuencia, la proteína p17 podría hacer más eficiente la replicación del DNA del fago $\phi 29$, como se ha visto que ocurre por comparación con un fago que no sintetiza la proteína p17 (Crucitti *et al.*, 1998). Como ya se ha comentado, la proteína p16.7 tiene la capacidad de unirse a DNA de cadena doble y simple y distribuye la replicación del DNA viral de manera helicoidal en la célula de *B. subtilis*. Esta distribución sería facilitada por la interacción de p16.7 con la proteína p17.

Por otro lado, se ha observado que la proteína p17 interacciona con la proteína p1 (experimento de doble híbrido en bacteria). En este sentido, mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina y PCR a tiempo real, se determinó la importancia que tienen la proteína p1 y la proteína p17 para una unión eficiente de la proteína p6 al DNA del fago $\phi 29$ *in vivo* (González-Huici *et al.*, 2004a). Cuando, bien la p1 o bien la p17 no está presente, la cantidad de DNA viral inmunoprecipitado mediante la proteína p6 es menor que cuando están presentes ambas proteínas p1 y p17 (*i. e.* en una infección con el fago $\phi 29$ silvestre). Además, la cantidad de DNA viral inmunoprecipitado por unión de la proteína p6 aumentaba proporcionalmente más en la infección con los fagos que no sintetizaban p1 o p17 que en la infección con el fago $\phi 29$ silvestre cuando se añadía novobiocina, respecto de la situación basal sin novobiocina. Ya que la novobiocina cambia la topología del DNA porque produce una pérdida de superhelicidad negativa en éste, las proteínas p1 y p17 podrían estar involucradas en el mantenimiento de la topología adecuada del DNA de $\phi 29$ y podrían facilitar así la unión de p6 al DNA viral.

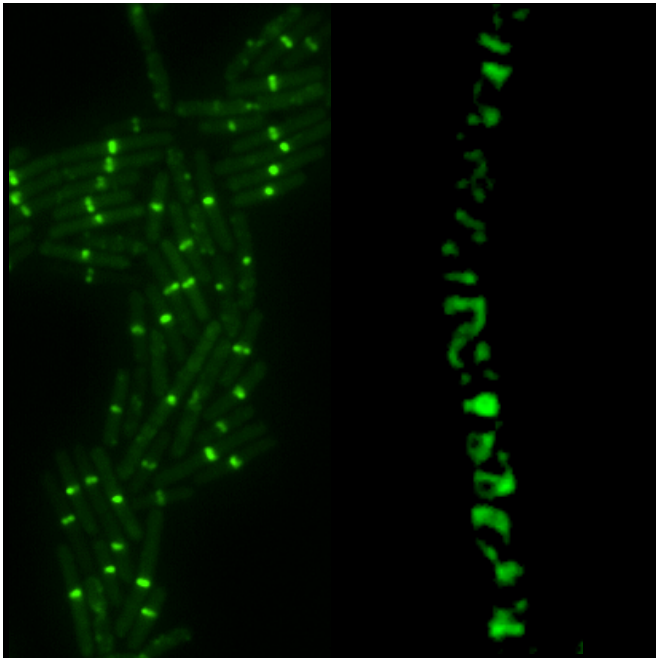
En conclusión, la proteína p1 desarrolla un papel importante en la replicación del DNA del bacteriófago $\phi 29$ *in vivo*. Su ausencia durante el desarrollo del ciclo viral produce una pérdida en la eficiencia de la replicación del DNA a 37 °C. Mediante la

asociación de la proteína p1 con el divisoma de *B. subtilis*, el fago $\phi 29$ modifica la longitud de la célula hospedadora y provoca que haya una mayor superficie de membrana donde se pueden reorganizar los genomas virales recién replicados. Como consecuencia de unas células con mayor longitud, se ha observado que el fago $\phi 29$ produce mayor cantidad de DNA viral a tiempos tardíos después de la infección y produce, también, mayor número de partículas infectivas que en las células de tamaño normal. La asociación de la proteína p1 con el divisoma depende de FtsZ, pero no depende de la síntesis del septo, como se ha determinado utilizando estirpes mutantes de *B. subtilis* que no sintetizan las proteínas FtsZ o PBP2B. Los resultados indican que la asociación de p1 con el divisoma ocurre mediante la interacción directa con FtsZ, y esto se basa en experimentos de *pull-down* y de entrecruzamiento químico *in vitro*. Esta interacción podría estar además estabilizada por la unión de la proteína p1 con la membrana bacteriana. Los resultados de esta tesis apoyan la importancia del segmento de aminoácidos VLFG (completamente conservado en proteínas homólogas a p1 en fagos de la familia de $\phi 29$) en la asociación con la membrana y en la naturaleza anfifílica de esta proteína. A nivel de interacción, tenemos evidencia de que p1 podría asociarse con la proteína viral p17 durante la infección, como se ha observado en ensayos de doble híbrido en bacteria. Las proteínas p1 y p17 son requeridas para mantener la topología correcta del DNA de $\phi 29$ durante el ciclo viral (González-Huici *et al.*, 2004a). Mediante experimentos de inmunofluorescencia, hemos mostrado que la proteína p17 localiza siguiendo un patrón helicoidal en la célula hospedadora y esta localización es independiente de la presencia de otras proteínas del fago, como p16.7, así como tampoco depende de la presencia de las proteínas del citoesqueleto bacteriano MreB, Mbl y MreBH. En conjunto, hemos profundizado en el conocimiento de la replicación del fago $\phi 29$ *in vivo* y en el papel biológico que juegan algunas de las proteínas que codifica, como la proteína p1 y la proteína p17.



Conclusiones

- 1-La región de la proteína p1 que contiene los aminoácidos desde la Val75 hasta la Ala80, que incluye el segmento VLFG, es importante para la asociación de la proteína p1 del bacteriófago $\phi 29$ a la membrana bacteriana. En particular, los aminoácidos del segmento VLFG de la proteína p1 parecen esenciales para que esta asociación tenga lugar.
- 2-La proteína p1 Δ C11 tiene una estructura secundaria con alto porcentaje de desorden.
- 3-La proteína p1 del bacteriófago $\phi 29$ localiza en el lugar donde se forma el divisoma en la célula de *B. subtilis*, tanto en células infectadas por el bacteriófago $\phi 29$ como en ausencia de otros componentes virales.
- 4-La proteína p1 se asocia *in vivo* con el divisoma de *B. subtilis*, colocalizando con el anillo Z, e interacciona con FtsZ *in vitro*.
- 5-La localización de la proteína p1 en el sitio del divisoma en la mitad celular se pierde en ausencia de FtsZ, por lo que su distribución subcelular depende de esta proteína. En cambio, la localización subcelular de la proteína p1 es independiente de la síntesis del septo.
- 6-La síntesis de la proteína p1 en células de *B. subtilis* produce alargamiento celular. Esto ocurre tanto en células infectadas con el fago $\phi 29$, como en células en las que no hay otros componentes virales aparte de la proteína p1.
- 7-Las células de *B. subtilis* con longitud incrementada presentan una mayor replicación del DNA del bacteriófago $\phi 29$ y una mayor formación de partículas virales infectivas.
- 8-La proteína p1 y la proteína p17 del fago $\phi 29$ interaccionan entre sí.
- 9-La proteína p17 del bacteriófago $\phi 29$ localiza siguiendo un patrón helicoidal en células de *B. subtilis* infectadas. Esta localización es independiente de la presencia de las proteínas citoesqueléticas MreB, Mbl y MreBH y de la proteína viral p16.7.
- 10-La proteína p17 colocaliza parcialmente con la proteína p16.7 del fago $\phi 29$ y ambas proteínas interaccionan *in vitro*.



Bibliografía

- Abdul-Gader, A., Miles, A.J. and Wallace, B.A. (2011). A reference dataset for the analyses of membrane protein secondary structures and transmembrane residues using circular dichroism spectroscopy. *Bioinformatics* 27, 1630-1636.
- Ackermann, H.W. (1998). Tailed bacteriophages: the order caudovirales. *Adv Virus Res* 51, 135-201.
- Adams, D.W. and Errington, J. (2009). Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nat Rev Microbiol* 7, 642-653.
- Addinall, S.G., Bi, E. and Lutkenhaus, J. (1996). FtsZ ring formation in fts mutants. *J Bacteriol* 178, 3877-3884.
- Albert, A., Muñoz-Espín, D., Jiménez, M., Asensio, J.L., Hermoso, J.A., Salas, M. and Meijer, W.J. (2005). Structural basis for membrane anchorage of viral ϕ 29 DNA during replication. *J Biol Chem* 280, 42486-42488.
- Alcorlo, M., González-Huici, V., Hermoso, J.M., Meijer, W.J. and Salas, M. (2007). The phage ϕ 29 membrane protein p16.7, involved in DNA replication, is required for efficient ejection of the viral genome. *J Bacteriol* 189, 5542-5549.
- Andrade, M.A., Chacon, P., Merelo, J.J. and Moran, F. (1993). Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Eng* 6, 383-390.
- Atreya, C.D., Kulkarni, S. and Mohan, K.V. (2004). Rubella virus P90 associates with the cytokinesis regulatory protein Citron-K kinase and the viral infection and constitutive expression of P90 protein both induce cell cycle arrest following S phase in cell culture. *Arch Virol* 149:779-89.
- Aylett, C.H., Izore, T., Amos, L.A. and Lowe, J. (2013). Structure of the tubulin/FtsZ-like protein TubZ from *Pseudomonas* bacteriophage Φ KZ. *J Mol Biol* 425, 2164-2173.
- Bais, H.P., Fall, R. and Vivanco, J.M. (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol* 134, 307-319.
- Barnes, M.H., Hammond, R.A., Kennedy, C.C., Mack, S.L. and Brown, N.C. (1992). Localization of the exonuclease and polymerase domains of *Bacillus subtilis* DNA polymerase III. *Gene* 111, 43-49.
- Barthelemy, I., Salas, M. and Mellado, R.P. (1986). *In vivo* transcription of bacteriophage ϕ 29 DNA: transcription initiation sites. *J Virol* 60, 874-879.
- Barthelemy, I., Salas, M. and Mellado, R.P. (1987). *In vivo* transcription of bacteriophage ϕ 29 DNA: transcription termination. *J Virol* 61, 1751-1755.
- Berka, R.M., Hahn, J., Albano, M., Draskovic, I., Persuh, M., Cui, X., Sloma, A., Widner, W. and Dubnau, D. (2002). Microarray analysis of the *Bacillus subtilis* K-state: genome-wide expression changes dependent on ComK. *Mol Microbiol* 43, 1331-1345.

- Berlatzky, I.A., Rouvinski, A. and Ben-Yehuda, S. (2008). Spatial organization of a replicating bacterial chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 14136-14140.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Blakely, G., May, G., McCulloch, R., Arciszewska, L.K., Burke, M., Lovett, S.T. and Sherratt, D.J. (1993). Two related recombinases are required for site-specific recombination at *dif* and *cer* in *E. coli* K12. *Cell* 75, 351-361.
- Blanco, L., Bernad, A., Lázaro, J.M., Martín, G., Garmendia, C. and Salas, M. (1989). Highly efficient DNA synthesis by the phage ϕ 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *J Biol Chem* 264, 8935-8940.
- Blanco, L., Lázaro, J.M., de Vega, M., Bonnin, A. and Salas, M. (1994). Terminal protein-primed DNA amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 12198-12202.
- Blasios, V., Bisson-Filho, A.W., Castellen, P., Nogueira, M.L., Bettini, J., Portugal, R.V., Zeri, A.C. and Gueiros-Filho, F.J. (2013). Genetic and biochemical characterization of the MinC-FtsZ interaction in *Bacillus subtilis*. *PLoS One* 8, e60690.
- Boye, E., Lobner-Olesen, A. and Skarstad, K. (2000). Limiting DNA replication to once and only once. *EMBO Rep* 1, 479-483.
- Bramkamp, M., Emmins, R., Weston, L., Donovan, C., Daniel, R.A. and Errington, J. (2008). A novel component of the division-site selection system of *Bacillus subtilis* and a new mode of action for the division inhibitor MinCD. *Mol Microbiol* 70, 1556-1569.
- Bramkamp, M. and van Baarle, S. (2009). Division site selection in rod-shaped bacteria. *Curr Opin Microbiol* 12, 683-688.
- Bravo, A., Hermoso, J.M. and Salas, M. (1994). A genetic approach to the identification of functional amino acids in protein p6 of *Bacillus subtilis* phage ϕ 29. *Mol Gen Genet* 245, 529-536.
- Bravo, A., Illana, B. and Salas, M. (2000). Compartmentalization of phage ϕ 29 DNA replication: interaction between the primer terminal protein and the membrane-associated protein p1. *EMBO J* 19, 5575-5584.
- Bravo, A. and Salas, M. (1997). Initiation of bacteriophage ϕ 29 DNA replication *in vivo*: assembly of a membrane-associated multiprotein complex. *J Mol Biol* 269, 102-112.
- Bravo, A. and Salas, M. (1998). Polymerization of bacteriophage ϕ 29 replication protein p1 into protofilament sheets. *EMBO J* 17, 6096-6105.
- Bravo, A., Serrano-Heras, G. and Salas, M. (2001). A single amino acid substitution within a coiled-coil motif changes the assembly of a 53-amino acid protein from two-dimensional sheets to filamentous structures. *J Biol Chem* 276, 21250-21256.

- Bruck, I., Goodman, M.F. and O'Donnell, M. (2003). The essential C family DnaE polymerase is error-prone and efficient at lesion bypass. *J Biol Chem* 278, 44361-44368.
- Buske, P.J. and Levin, P.A. (2013). A flexible C-terminal linker is required for proper FtsZ assembly *in vitro* and cytokinetic ring formation *in vivo*. *Mol Microbiol* 89, 249-263.
- Calles, B., Salas, M. and Rojo, F. (2002). The $\phi 29$ transcriptional regulator contacts the nucleoid protein p6 to organize a repression complex. *EMBO J* 21, 6185-6194.
- Camacho, A. and Salas, M. (2001). Mechanism for the switch of $\phi 29$ DNA early to late transcription by regulatory protein p4 and histone-like protein p6. *EMBO J* 20, 6060-6070.
- Camacho, A. and Salas, M. (2004). Molecular interplay between RNA polymerase and two transcriptional regulators in promoter switch. *J Mol Biol* 336, 357-368.
- Camacho, A. and Salas, M. (2010). DNA bending and looping in the transcriptional control of bacteriophage $\phi 29$. *FEMS Microbiol Rev* 34, 828-841.
- Carnoy, C. and Roten, C.A. (2009). The *dif*/Xer recombination systems in proteobacteria. *PLoS One* 4, e6531.
- Carrascosa, J.L., Camacho, A., Moreno, F., Jiménez, F., Mellado, R.P., Viñuela, E. and Salas, M. (1976). *Bacillus subtilis* phage $\phi 29$. Characterization of gene products and functions. *Eur J Biochem* 66, 229-241.
- Castilla-Llorente, V., Muñoz-Espín, D., Villar, L., Salas, M. and Meijer, W.J. (2006). Spo0A, the key transcriptional regulator for entrance into sporulation, is an inhibitor of DNA replication. *EMBO J* 25, 3890-3899.
- Celler, K., Koning, R.I., Koster, A.J. and van Wezel, G.P. (2013). Multidimensional view of the bacterial cytoskeleton. *J Bacteriol* 195, 1627-1636.
- Chen, Y., Bjornson, K., Redick, S.D. and Erickson, H.P. (2005). A rapid fluorescence assay for FtsZ assembly indicates cooperative assembly with a dimer nucleus. *Biophys J* 88, 505-514.
- Clerget, M. (1991). Site-specific recombination promoted by a short DNA segment of plasmid R1 and by a homologous segment in the terminus region of the *Escherichia coli* chromosome. *New Biol* 3, 780-788.
- Compton, L.A. and Johnson, W.C., Jr. (1986). Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. *Anal Biochem* 155, 155-167.
- Costes, A., Lecoite, F., McGovern, S., Quevillon-Cheruel, S. and Polard, P. (2010). The C-terminal domain of the bacterial SSB protein acts as a DNA maintenance hub at active chromosome replication forks. *PLoS Genet* 6, e1001238.

- Crucitti, P., Abril, A.M. and Salas, M. (2003). Bacteriophage ϕ 29 early protein p17. Self-association and hetero-association with the viral histone-like protein p6. *J Biol Chem* 278, 4906-4911.
- Crucitti, P., Lázaro, J.M., Benes, V. and Salas, M. (1998). Bacteriophage ϕ 29 early protein p17 is conditionally required for the first rounds of viral DNA replication. *Gene* 223, 135-142.
- Daniel, R.A., Harry, E.J. and Errington, J. (2000). Role of penicillin-binding protein PBP 2B in assembly and functioning of the division machinery of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 35, 299-311.
- Davey, N.E., Trave, G. and Gibson, T.J. (2011). How viruses hijack cell regulation. *Trends Biochem Sci* 36, 159-169.
- de Boer, P., Crossley, R. and Rothfield, L. (1992). The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. *Nature* 359, 254-256.
- Dervyn, E., Suski, C., Daniel, R., Bruand, C., Chapuis, J., Errington, J., Janniere, L. and Ehrlich, S.D. (2001). Two essential DNA polymerases at the bacterial replication fork. *Science* 294, 1716-1719.
- Dubnau, D. and Losick, R. (2006). Bistability in bacteria. *Mol Microbiol* 61, 564-572.
- Duggin, I.G., Andersen, P.A., Smith, M.T., Wilce, J.A., King, G.F. and Wake, R.G. (1999). Site-directed mutants of RTP of *Bacillus subtilis* and the mechanism of replication fork arrest. *J Mol Biol* 286, 1325-1335.
- Duggin, I.G., Wake, R.G., Bell, S.D. and Hill, T.M. (2008). The replication fork trap and termination of chromosome replication. *Mol Microbiol* 70, 1323-1333.
- Dunker, A.K., Lawson, J.D., Brown, C.J., Williams, R.M., Romero, P., Oh, J.S., Oldfield, C.J., Campen, A.M., Ratliff, C.M., Hipps, K.W., *et al.* (2001). Intrinsically disordered protein. *J Mol Graph Model* 19, 26-59.
- Dunker, A.K., Obradovic, Z., Romero, P., Garner, E.C. and Brown, C.J. (2000). Intrinsic protein disorder in complete genomes. *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform* 11, 161-171.
- El-Helow, E.R. (2001). Identification and molecular characterization of a novel *Bacillus* strain capable of degrading Tween-80. *FEMS Microbiol Lett* 196, 119-122.
- Elías-Arnanz, M. and Salas, M. (1999). Functional interactions between a phage histone-like protein and a transcriptional factor in regulation of ϕ 29 early-late transcriptional switch. *Genes Dev* 13, 2502-2513.
- Erickson, H.P. (1995). FtsZ, a prokaryotic homolog of tubulin? *Cell* 80, 367-370.
- Erickson, H.P., Anderson, D.E. and Osawa, M. (2010). FtsZ in bacterial cytokinesis: cytoskeleton and force generator all in one. *Microbiol Mol Biol Rev* 74, 504-528.

- Erickson, H.P. and Stoffler, D. (1996). Protofilaments and rings, two conformations of the tubulin family conserved from bacterial FtsZ to alpha/beta and gamma tubulin. *J Cell Biol* 135, 5-8.
- Erickson, H.P., Taylor, D.W., Taylor, K.A. and Bramhill, D. (1996). Bacterial cell division protein FtsZ assembles into protofilament sheets and minirings, structural homologs of tubulin polymers. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 519-523.
- Errington, J., Daniel, R.A. and Scheffers, D.J. (2003). Cytokinesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 52-65.
- Eswaramoorthy, P., Erb, M.L., Gregory, J.A., Silverman, J., Pogliano, K., Pogliano, J. and Ramamurthi, K.S. (2011). Cellular architecture mediates DivIVA ultrastructure and regulates min activity in *Bacillus subtilis*. *MBio* 2, e00257-11
- Feucht, A. and Lewis, P.J. (2001). Improved plasmid vectors for the production of multiple fluorescent protein fusions in *Bacillus subtilis*. *Gene* 264, 289-297.
- Feucht, A., Lucet, I., Yudkin, M.D. and Errington, J. (2001). Cytological and biochemical characterization of the FtsA cell division protein of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 40, 115-125.
- Formstone, A. and Errington, J. (2005). A magnesium-dependent *mreB* null mutant: implications for the role of *mreB* in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 55, 1646-1657.
- Fukuoka, T., Moriya, S., Yoshikawa, H. and Ogasawara, N. (1990). Purification and characterization of an initiation protein for chromosomal replication, DnaA, in *Bacillus subtilis*. *J Biochem* 107, 732-739.
- Gajiwala, K.S. and Burley, S.K. (2000). Winged helix proteins. *Curr Opin Struct Biol* 10, 110-116.
- Gamba, P., Veening, J.W., Saunders, N.J., Hamoen, L.W. and Daniel, R.A. (2009). Two-step assembly dynamics of the *Bacillus subtilis* divisome. *J Bacteriol* 191, 4186-4194.
- Gardner, K.A., Moore, D.A. and Erickson, H.P. (2013). The C-terminal linker of *Escherichia coli* FtsZ functions as an intrinsically disordered peptide. *Mol Microbiol* 89, 264-275.
- Gass, K.B. and Cozzarelli, N.R. (1973). Further genetic and enzymological characterization of the three *Bacillus subtilis* deoxyribonucleic acid polymerases. *J Biol Chem* 248, 7688-7700.
- Glass, J.I., Lefkowitz, E.J., Glass, J.S., Heiner, C.R., Chen, E.Y. and Cassell, G.H. (2000). The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. *Nature* 407, 757-762.
- Glockner, F.O., Kube, M., Bauer, M., Teeling, H., Lombardot, T., Ludwig, W., Gade, D., Beck, A., Borzym, K., Heitmann, K., *et al.* (2003). Complete genome sequence of

the marine planctomycete *Pirellula* sp. strain 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 8298-8303.

González-Huici, V., Alcorlo, M., Salas, M. and Hermoso, J.M. (2004a). Phage ϕ 29 proteins p1 and p17 are required for efficient binding of architectural protein p6 to viral DNA *in vivo*. *J Bacteriol* 186, 8401-8406.

González-Huici, V., Lázaro, J.M., Salas, M. and Hermoso, J.M. (2000). Specific recognition of parental terminal protein by DNA polymerase for initiation of protein-primed DNA replication. *J Biol Chem* 275, 14678-14683.

González-Huici, V., Salas, M. and Hermoso, J.M. (2004b). The push-pull mechanism of bacteriophage ϕ 29 DNA injection. *Mol Microbiol* 52, 529-540.

González-Huici, V., Salas, M. and Hermoso, J.M. (2006). Requirements for *Bacillus subtilis* bacteriophage ϕ 29 DNA ejection. *Gene* 374, 19-25.

Griffiths, A.A., Andersen, P.A. and Wake, R.G. (1998). Replication terminator protein-based replication fork-arrest systems in various *Bacillus* species. *J Bacteriol* 180, 3360-3367.

Gueiros-Filho, F.J. (2012). Cell division. In *Bacillus Cellular and Molecular Biology*, P.L. Graumann, ed. (Norfolk, UK, Caister Academic Press), pp. 85-122.

Gueiros-Filho, F.J. and Losick, R. (2002). A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Genes Dev* 16, 2544-2556.

Gundogdu, M.E., Kawai, Y., Pavlendova, N., Ogasawara, N., Errington, J., Scheffers, D.J. and Hamoen, L.W. (2011). Large ring polymers align FtsZ polymers for normal septum formation. *EMBO J* 30, 617-626.

Gutiérrez, C., Sogo, J.M. and Salas, M. (1991). Analysis of replicative intermediates produced during bacteriophage ϕ 29 DNA replication *in vitro*. *J Mol Biol* 222, 983-994.

Haeusser, D.P., Garza, A.C., Buscher, A.Z. and Levin, P.A. (2007). The division inhibitor EzrA contains a seven-residue patch required for maintaining the dynamic nature of the medial FtsZ ring. *J Bacteriol* 189, 9001-9010.

Haeusser, D.P., Schwartz, R.L., Smith, A.M., Oates, M.E. and Levin, P.A. (2004). EzrA prevents aberrant cell division by modulating assembly of the cytoskeletal protein FtsZ. *Mol Microbiol* 52, 801-814.

Hagen, E.W., Reilly, B.E., Tosi, M.E. and Anderson, D.L. (1976). Analysis of gene function of bacteriophage ϕ 29 of *Bacillus subtilis*: identification of cistrons essential for viral assembly. *J Virol* 19, 501-517.

Hahn, J., Maier, B., Haijema, B.J., Sheetz, M. and Dubnau, D. (2005). Transformation proteins and DNA uptake localize to the cell poles in *Bacillus subtilis*. *Cell* 122, 59-71.

- Halbach, A., Landgraf, C., Lorenzen, S., Rosenkranz, K., Volkmer-Engert, R., Erdmann, R. and Rottensteiner, H. (2006). Targeting of the tail-anchored peroxisomal membrane proteins PEX26 and PEX15 occurs through C-terminal PEX19-binding sites. *J Cell Sci* 119, 2508-2517.
- Harry, E., Monahan, L. and Thompson, L. (2006). Bacterial cell division: the mechanism and its precision. *Int Rev Cytol* 253, 27-94.
- Hendrickson, H. and Lawrence, J.G. (2007). Mutational bias suggests that replication termination occurs near the *dif* site, not at Ter sites. *Mol Microbiol* 64, 42-56.
- Hong, H.A., Duc le, H. and Cutting, S.M. (2005). The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol Rev* 29, 813-835.
- Huang, K.H., Durand-Heredia, J. and Janakiraman, A. (2013). FtsZ ring stability: of bundles, tubules, crosslinks, and curves. *J Bacteriol* 195, 1859-1868.
- Imai, Y., Ogasawara, N., Ishigo-Oka, D., Kadoya, R., Daito, T. and Moriya, S. (2000). Subcellular localization of Dna-initiation proteins of *Bacillus subtilis*: evidence that chromosome replication begins at either edge of the nucleoids. *Mol Microbiol* 36, 1037-1048.
- Inatsu, Y., Nakamura, N., Yuriko, Y., Fushimi, T., Watanasiritum, L. and Kawamoto, S. (2006). Characterization of *Bacillus subtilis* strains in Thua nao, a traditional fermented soybean food in northern Thailand. *Lett Appl Microbiol* 43, 237-242.
- Inciarte, M.R., Salas, M. and Sogo, J.M. (1980). Structure of replicating DNA molecules of *Bacillus subtilis* bacteriophage ϕ 29. *J Virol* 34, 187-199.
- Ivarie, R.D. and Pene, J.J. (1973). DNA replication in bacteriophage ϕ 29: the requirement of a viral-specific product for association of ϕ 29 DNA with the cell membrane of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Virology* 52, 351-362.
- Jenkins, C., Samudrala, R., Anderson, I., Hedlund, B.P., Petroni, G., Michailova, N., Pinel, N., Overbeek, R., Rosati, G. and Staley, J.T. (2002). Genes for the cytoskeletal protein tubulin in the bacterial genus *Prostheobacter*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 17049-17054.
- Jensen, S.O., Thompson, L.S. and Harry, E.J. (2005). Cell division in *Bacillus subtilis*: FtsZ and FtsA association is Z-ring independent, and FtsA is required for efficient midcell Z-Ring assembly. *J Bacteriol* 187, 6536-6544.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A. and Ladant, D. (1998). A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 5752-5756.
- Kearns, D.B. and Losick, R. (2005). Cell population heterogeneity during growth of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* 19, 3083-3094.

- Kelly, S.M., Jess, T.J. and Price, N.C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta* 1751, 119-139.
- Kiefel, B.R., Gilson, P.R. and Beech, P.L. (2004). Diverse eukaryotes have retained mitochondrial homologues of the bacterial division protein FtsZ. *Protist* 155, 105-115.
- Kiro, R., Molshanski-Mor, S., Yosef, I., Milam, S.L., Erickson, H.P. and Qimron, U. (2013). Gene product 0.4 increases bacteriophage T7 competitiveness by inhibiting host cell division. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 19549-19554.
- Kobayashi, K., Ehrlich, S.D., Albertini, A., Amati, G., Andersen, K.K., Arnaud, M., Asai, K., Ashikaga, S., Aymerich, S., Bessieres, P., *et al.* (2003). Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 4678-4683.
- Konings, W.N., Bisschop, A., Veenhuis, M. and Vermeulen, C.A. (1973). New procedure for the isolation of membrane vesicles of *Bacillus subtilis* and an electron microscopy study of their ultrastructure. *J Bacteriol* 116, 1456-1465.
- Kono, N., Arakawa, K. and Tomita, M. (2011). Comprehensive prediction of chromosome dimer resolution sites in bacterial genomes. *BMC Genomics* 12, 19.
- Kraemer, J.A., Erb, M.L., Waddling, C.A., Montabana, E.A., Zehr, E.A., Wang, H., Nguyen, K., Pham, D.S., Agard, D.A. and Pogliano, J. (2012). A phage tubulin assembles dynamic filaments by an atypical mechanism to center viral DNA within the host cell. *Cell* 149, 1488-1499.
- Kralicek, A.V., Wilson, P.K., Ralston, G.B., Wake, R.G. and King, G.F. (1997). Reorganization of terminator DNA upon binding replication terminator protein: implications for the functional replication fork arrest complex. *Nucleic Acids Res* 25, 590-596.
- Krause, M., Ruckert, B., Lurz, R. and Messer, W. (1997). Complexes at the replication origin of *Bacillus subtilis* with homologous and heterologous DnaA protein. *J Mol Biol* 274, 365-380.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., *et al.* (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390, 249-256.
- Kutay, U., Ahnert-Hilger, G., Hartmann, E., Wiedenmann, B. and Rapoport, T.A. (1995). Transport route for synaptobrevin via a novel pathway of insertion into the endoplasmic reticulum membrane. *EMBO J* 14, 217-223.
- Kutay, U., Hartmann, E. and Rapoport, T.A. (1993). A class of membrane proteins with a C-terminal anchor. *Trends Cell Biol* 3, 72-75.
- Larsen, R.A., Cusumano, C., Fujioka, A., Lim-Fong, G., Patterson, P. and Pogliano, J. (2007). Treadmilling of a prokaryotic tubulin-like protein, TubZ, required for plasmid stability in *Bacillus thuringiensis*. *Genes Dev* 21, 1340-1352.

Le Chatelier, E., Becherel, O.J., d'Alençon, E., Canceill, D., Ehrlich, S.D., Fuchs, R.P. and Janniere, L. (2004). Involvement of DnaE, the second replicative DNA polymerase from *Bacillus subtilis*, in DNA mutagenesis. *J Biol Chem* 279, 1757-1767.

Lee, P.S. and Grossman, A.D. (2006). The chromosome partitioning proteins Soj (ParA) and Spo0J (ParB) contribute to accurate chromosome partitioning, separation of replicated sister origins, and regulation of replication initiation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 60, 853-869.

Lees, J.G., Miles, A.J., Janes, R.W. and Wallace, B.A. (2006a). Novel methods for secondary structure determination using low wavelength (VUV) circular dichroism spectroscopic data. *BMC Bioinformatics* 7, 507.

Lees, J.G., Miles, A.J., Wien, F. and Wallace, B.A. (2006b). A reference database for circular dichroism spectroscopy covering fold and secondary structure space. *Bioinformatics* 22, 1955-1962.

Lemon, K.P. and Grossman, A.D. (1998). Localization of bacterial DNA polymerase: evidence for a factory model of replication. *Science* 282, 1516-1519.

Lemon, K.P. and Grossman, A.D. (2000). Movement of replicating DNA through a stationary replisome. *Mol Cell* 6, 1321-1330.

Leser, T.D., Knarreborg, A. and Worm, J. (2008). Germination and outgrowth of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* spores in the gastrointestinal tract of pigs. *J Appl Microbiol* 104, 1025-1033.

Levin, P.A., Kurtser, I.G. and Grossman, A.D. (1999). Identification and characterization of a negative regulator of FtsZ ring formation in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 9642-9647.

Lewis, P.J. and Errington, J. (1997). Direct evidence for active segregation of *oriC* regions of the *Bacillus subtilis* chromosome and co-localization with the Spo0J partitioning protein. *Mol Microbiol* 25, 945-954.

Lewis, P.J., Ralston, G.B., Christopherson, R.I. and Wake, R.G. (1990). Identification of the replication terminator protein binding sites in the terminus region of the *Bacillus subtilis* chromosome and stoichiometry of the binding. *J Mol Biol* 214, 73-84.

Lewis, P.J., Smith, M.T. and Wake, R.G. (1989). A protein involved in termination of chromosome replication in *Bacillus subtilis* binds specifically to the *terC* site. *J Bacteriol* 171, 3564-3567.

Lewis, P.J., Thaker, S.D. and Errington, J. (2000). Compartmentalization of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *EMBO J* 19, 710-718.

Lindner, C., Nijland, R., van Hartskamp, M., Bron, S., Hamoen, L.W. and Kuipers, O.P. (2004). Differential expression of two paralogous genes of *Bacillus subtilis* encoding single-stranded DNA binding protein. *J Bacteriol* 186, 1097-1105.

- Lowe, J. and Amos, L.A. (1998). Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* 391, 203-206.
- Lutkenhaus, J. (2007). Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring. *Annu Rev Biochem* 76, 539-562.
- Lutkenhaus, J., Pichoff, S. and Du, S. (2012). Bacterial cytokinesis: From Z ring to divisome. *Cytoskeleton (Hoboken)* 69, 778-790.
- Maamar, H. and Dubnau, D. (2005). Bistability in the *Bacillus subtilis* K-state (competence) system requires a positive feedback loop. *Mol Microbiol* 56, 615-624.
- Manna, A.C., Pai, K.S., Bussiere, D.E., White, S.W. and Bastia, D. (1996). The dimer-dimer interaction surface of the replication terminator protein of *Bacillus subtilis* and termination of DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 3253-3258.
- Mao, D., Wachter, E. and Wallace, B.A. (1982). Folding of the mitochondrial proton adenosinetriphosphatase proteolipid channel in phospholipid vesicles. *Biochemistry* 21, 4960-4968.
- Margolin, W. (2009). Sculpting the bacterial cell. *Curr Biol* 19, R812-822.
- Marston, A.L. and Errington, J. (1999). Selection of the midcell division site in *Bacillus subtilis* through MinD-dependent polar localization and activation of MinC. *Mol Microbiol* 33, 84-96.
- Marston, A.L., Thomaides, H.B., Edwards, D.H., Sharpe, M.E. and Errington, J. (1998). Polar localization of the MinD protein of *Bacillus subtilis* and its role in selection of the mid-cell division site. *Genes Dev* 12, 3419-3430.
- Martín, G. and Salas, M. (1988). Characterization and cloning of gene 5 of *Bacillus subtilis* phage ϕ 29. *Gene* 67, 193-201.
- Meijer, W.J., Horcajadas, J.A. and Salas, M. (2001a). ϕ 29 family of phages. *Microbiol Mol Biol Rev* 65, 261-287.
- Meijer, W.J., Lewis, P.J., Errington, J. and Salas, M. (2000). Dynamic relocation of phage ϕ 29 DNA during replication and the role of the viral protein p16.7. *EMBO J* 19, 4182-4190.
- Meijer, W.J., Serna-Rico, A. and Salas, M. (2001b). Characterization of the bacteriophage ϕ 29-encoded protein p16.7: a membrane protein involved in phage DNA replication. *Mol Microbiol* 39, 731-746.
- Méndez, J., Blanco, L., Esteban, J.A., Bernad, A. and Salas, M. (1992). Initiation of ϕ 29 DNA replication occurs at the second 3' nucleotide of the linear template: a sliding-back mechanism for protein-primed DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 9579-9583.

- Méndez, J., Blanco, L. and Salas, M. (1997). Protein-primed DNA replication: a transition between two modes of priming by a unique DNA polymerase. *EMBO J* 16, 2519-2527.
- Merrikh, H. and Grossman, A.D. (2011). Control of the replication initiator DnaA by an anti-cooperativity factor. *Mol Microbiol* 82, 434-446.
- Miranda, C.A., Martins, O.B. and Clementino, M.M. (2008). Species-level identification of *Bacillus* strains isolates from marine sediments by conventional biochemical, 16S rRNA gene sequencing and inter-tRNA gene sequence lengths analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek* 93, 297-304.
- Mohammadi, T., van Dam, V., Sijbrandi, R., Vernet, T., Zapun, A., Bouhss, A., Diepeveen-de Bruin, M., Nguyen-Disteche, M., de Kruijff, B. and Breukink, E. (2011). Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane. *EMBO J* 30, 1425-1432.
- Mukherjee, A., Dai, K. and Lutkenhaus, J. (1993). *Escherichia coli* cell division protein FtsZ is a guanine nucleotide binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 1053-1057.
- Mukherjee, A. and Lutkenhaus, J. (1994). Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments. *J Bacteriol* 176, 2754-2758.
- Muñoz-Espín, D., Daniel, R., Kawai, Y., Carballido-López, R., Castilla-Llorente, V., Errington, J., Meijer, W.J. and Salas, M. (2009). The actin-like MreB cytoskeleton organizes viral DNA replication in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:13347-13352.
- Muñoz-Espín, D., Holguera, I., Ballesteros-Plaza, D., Carballido-López, R. and Salas, M. (2010). Viral terminal protein directs early organization of phage DNA replication at the bacterial nucleoid. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 16548-16553.
- Muñoz-Espín, D., Serrano-Heras, G. and Salas, M. (2012). Role of host factors in bacteriophage ϕ 29 DNA replication. *Adv Virus Res* 82, 351-383.
- Murray, H. and Errington, J. (2008). Dynamic control of the DNA replication initiation protein DnaA by Soj/ParA. *Cell* 135, 74-84.
- Nogales, E., Downing, K.H., Amos, L.A. and Lowe, J. (1998). Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nat Struct Biol* 5, 451-458.
- Noirot-Gros, M.F., Velten, M., Yoshimura, M., McGovern, S., Morimoto, T., Ehrlich, S.D., Ogasawara, N., Polard, P. and Noirot, P. (2006). Functional dissection of YabA, a negative regulator of DNA replication initiation in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 2368-2373.
- Ogasawara, N. and Yoshikawa, H. (1992). Genes and their organization in the replication origin region of the bacterial chromosome. *Mol Microbiol* 6, 629-634.

- Oliva, M.A., Martin-Galiano, A.J., Sakaguchi, Y. and Andreu, J.M. (2012). Tubulin homolog TubZ in a phage-encoded partition system. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 7711-7716.
- Osteryoung, K.W. and Nunnari, J. (2003). The division of endosymbiotic organelles. *Science* 302, 1698-1704.
- Patrick, J.E. and Kearns, D.B. (2008). MinJ (YvjD) is a topological determinant of cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 70, 1166-1179.
- Pichoff, S. and Lutkenhaus, J. (2005). Tethering the Z ring to the membrane through a conserved membrane targeting sequence in FtsA. *Mol Microbiol* 55, 1722-1734.
- Pilhofer, M. and Jensen, G.J. (2013). The bacterial cytoskeleton: more than twisted filaments. *Curr Opin Cell Biol* 25, 125-133.
- Pilhofer, M., Ladinsky, M.S., McDowall, A.W., Petroni, G. and Jensen, G.J. (2011). Microtubules in bacteria: Ancient tubulins build a five-protofilament homolog of the eukaryotic cytoskeleton. *PLoS Biol* 9, e1001213.
- Priest, F.G. (1993). Systematics and ecology of *Bacillus*. In *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics, A.L. Sonenshein, Hoch, J.A., Losick, R., ed. (Washington D. C, American Society for Microbiology), pp. 3-16.
- Prieto, I., Méndez, E. and Salas, M. (1989). Characterization, overproduction and purification of the product of gene *I* of *Bacillus subtilis* phage ϕ 29. *Gene* 77, 195-204.
- Provencher, S.W. and Glockner, J. (1981). Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* 20, 33-37.
- RayChaudhuri, D. and Park, J.T. (1992). *Escherichia coli* cell-division gene *ftsZ* encodes a novel GTP-binding protein. *Nature* 359, 251-254.
- Robinson, A., Causer, R.J. and Dixon, N.E. (2012). Architecture and conservation of the bacterial DNA replication machinery, an underexploited drug target. *Curr Drug Targets* 13, 352-372.
- Rodrigues, C.D. and Harry, E.J. (2012). The Min system and nucleoid occlusion are not required for identifying the division site in *Bacillus subtilis* but ensure its efficient utilization. *PLoS Genet* 8, e1002561.
- Rojo, F., Mencía, M., Monsalve, M. and Salas, M. (1998). Transcription activation and repression by interaction of a regulator with the alpha subunit of RNA polymerase: the model of phage ϕ 29 protein p4. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 60, 29-46.
- Rudrappa, T., Quinn, W.J., Stanley-Wall, N.R. and Bais, H.P. (2007). A degradation product of the salicylic acid pathway triggers oxidative stress resulting in down-regulation of *Bacillus subtilis* biofilm formation on *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta* 226, 283-297.

- Salas, M. (1991). Protein-priming of DNA replication. *Annu Rev Biochem* 60, 39-71.
- Salas, M. (1999). Mechanisms of initiation of linear DNA replication in prokaryotes. *Genet Eng (N Y)* 21, 159-171.
- Salas, M., Mellado, R.P. and Viñuela, E. (1978). Characterization of a protein covalently linked to the 5' termini of the DNA of *Bacillus subtilis* phage ϕ 29. *J Mol Biol* 119, 269-291.
- Salas, M. and Rojo, F. (1993). Replication and transcription of bacteriophage ϕ 29. In *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics, A.L. Sonenshein, Hoch, J. A., Losick, R., ed. (Washington D. C., American Society for Microbiology), pp. 843-858.
- Sanders, G.M., Dallmann, H.G. and McHenry, C.S. (2010). Reconstitution of the *B. subtilis* replisome with 13 proteins including two distinct replicases. *Mol Cell* 37, 273-281.
- Sanjanwala, B. and Ganesan, A.T. (1989). DNA polymerase III gene of *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 4421-4424.
- Sanjanwala, B. and Ganesan, A.T. (1991). Genetic structure and domains of DNA polymerase III of *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet* 226, 467-472.
- Scholefield, G., Errington, J. and Murray, H. (2012). Soj/ParA stalls DNA replication by inhibiting helix formation of the initiator protein DnaA. *EMBO J* 31, 1542-1555.
- Scholefield, G., Whiting, R., Errington, J. and Murray, H. (2011). Spo0J regulates the oligomeric state of Soj to trigger its switch from an activator to an inhibitor of DNA replication initiation. *Mol Microbiol* 79, 1089-1100.
- Serna-Rico, A., Illana, B., Salas, M. and Meijer, W.J. (2000). The putative coiled coil domain of the ϕ 29 terminal protein is a major determinant involved in recognition of the origin of replication. *J Biol Chem* 275, 40529-40538.
- Serna-Rico, A., Muñoz-Espín, D., Villar, L., Salas, M. and Meijer, W.J. (2003). The integral membrane protein p16.7 organizes *in vivo* ϕ 29 DNA replication through interaction with both the terminal protein and ssDNA. *EMBO J* 22, 2297-2306.
- Serna-Rico, A., Salas, M. and Meijer, W.J. (2002). The *Bacillus subtilis* phage ϕ 29 protein p16.7, involved in ϕ 29 DNA replication, is a membrane-localized single-stranded DNA-binding protein. *J Biol Chem* 277, 6733-6742.
- Serrano, M., Gutiérrez, C., Freire, R., Bravo, A., Salas, M. and Hermoso, J.M. (1994). Phage ϕ 29 protein p6: a viral histone-like protein. *Biochimie* 76, 981-991.
- Serrano, M., Salas, M. and Hermoso, J.M. (1990). A novel nucleoprotein complex at a replication origin. *Science* 248, 1012-1016.

- Serrano-Heras, G., Bravo, A. and Salas, M. (2008). Phage ϕ 29 protein p56 prevents viral DNA replication impairment caused by uracil excision activity of uracil-DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 19044-19049.
- Serrano-Heras, G., Ruiz-Maso, J.A., del Solar, G., Espinosa, M., Bravo, A. and Salas, M. (2007). Protein p56 from the *Bacillus subtilis* phage ϕ 29 inhibits DNA-binding ability of uracil-DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res* 35, 5393-5401.
- Serrano-Heras, G., Salas, M. and Bravo, A. (2003). *In vivo* assembly of phage ϕ 29 replication protein p1 into membrane-associated multimeric structures. *J Biol Chem* 278, 40771-40777.
- Serrano-Heras, G., Salas, M. and Bravo, A. (2005). A new plasmid vector for regulated gene expression in *Bacillus subtilis*. *Plasmid* 54, 278-282.
- Serrano-Heras, G., Salas, M. and Bravo, A. (2006). A uracil-DNA glycosylase inhibitor encoded by a non-uracil containing viral DNA. *J Biol Chem* 281, 7068-7074.
- Siala, A.H., I.R.; Gray, T.R.G. (1974). Populations of spore-forming bacteria in an acid forest soil, with special reference to *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol* 81, 183-190.
- Singh, J.K., Makde, R.D., Kumar, V. and Panda, D. (2008). SepF increases the assembly and bundling of FtsZ polymers and stabilizes FtsZ protofilaments by binding along its length. *J Biol Chem* 283, 31116-31124.
- Skarstad, K. and Boye, E. (1994). The initiator protein DnaA: evolution, properties and function. *Biochim Biophys Acta* 1217, 111-130.
- Smith, M.T. and Wake, R.G. (1992). Definition and polarity of action of DNA replication terminators in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* 227, 648-657.
- Smits, W.K., Goranov, A.I. and Grossman, A.D. (2010). Ordered association of helicase loader proteins with the *Bacillus subtilis* origin of replication *in vivo*. *Mol Microbiol* 75, 452-461.
- Soengas, M.S., Esteban, J.A., Lázaro, J.M., Bernad, A., Blasco, M.A., Salas, M. and Blanco, L. (1992). Site-directed mutagenesis at the Exo III motif of ϕ 29 DNA polymerase; overlapping structural domains for the 3'-5' exonuclease and strand-displacement activities. *EMBO J* 11, 4227-4237.
- Sogo, J.M., Lozano, M. and Salas, M. (1984). *In vitro* transcription of the *Bacillus subtilis* phage ϕ 29 DNA by *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* RNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 12, 1943-1960.
- Soufo, C.D., Soufo, H.J., Noirot-Gros, M.F., Steindorf, A., Noirot, P. and Graumann, P.L. (2008). Cell-cycle-dependent spatial sequestration of the DnaA replication initiator protein in *Bacillus subtilis*. *Dev Cell* 15, 935-941.

- Sreerama, N., Venyaminov, S.Y. and Woody, R.W. (1999). Estimation of the number of alpha-helical and beta-strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. *Protein Sci* 8, 370-380.
- Sreerama, N., Venyaminov, S.Y. and Woody, R.W. (2000). Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: inclusion of denatured proteins with native proteins in the analysis. *Anal Biochem* 287, 243-251.
- Sreerama, N. and Woody, R.W. (2000). Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem* 287, 252-260.
- Steiner, M., Lubitz, W. and Blasi, U. (1993). The missing link in phage lysis of gram-positive bacteria: gene 14 of *Bacillus subtilis* phage ϕ 29 encodes the functional homolog of lambda S protein. *J Bacteriol* 175, 1038-1042.
- Sullivan, N.L., Marquis, K.A. and Rudner, D.Z. (2009). Recruitment of SMC by ParB-*parS* organizes the origin region and promotes efficient chromosome segregation. *Cell* 137, 697-707.
- Suomalainen, M., Nakano, M.Y., Keller, S., Boucke, K., Stidwill, R.P. and Greber, U.F. (1999). *J Cell Biol* 144:657-672.
- Tabor, S. and Richardson, C.C. (1985). A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 1074-1078.
- Talavera, A., Salas, M. and Viñuela, E. (1972). Temperature-sensitive mutants affected in DNA synthesis in phage ϕ 29 of *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem* 31, 367-371.
- Tam, N.K., Uyen, N.Q., Hong, H.A., Duc le, H., Hoa, T.T., Serra, C.R., Henriques, A.O. and Cutting, S.M. (2006). The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. *J Bacteriol* 188, 2692-2700.
- Tamanoi, F., Okazaki, T. and Okazaki, R. (1977). Persistence of RNA attached to nascent short DNA pieces in *Bacillus subtilis* cells defective in DNA polymerase I. *Biochem Biophys Res Commun* 77, 290-297.
- Tang, M., Bideshi, D.K., Park, H.W. and Federici, B.A. (2006). Minireplicon from pBtoxis of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl Environ Microbiol* 72, 6948-6954.
- Taylor, M.P., Koyuncu, O.O. and Enquist, L.W. (2011). Subversion of the actin cytoskeleton during viral infection. *Nat Rev Microbiol* 9:427-39.
- Teeter, M.M. and Whitlow, M. (1988). Test of circular dichroism (CD) methods for crambin and CD-assisted secondary structure prediction of its homologous toxins. *Proteins* 4, 262-273.

Tinsley, E. and Khan, S.A. (2006). A novel FtsZ-like protein is involved in replication of the anthrax toxin-encoding pXO1 plasmid in *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* 188, 2829-2835.

Turner, I.J., Scott, D.J., Allen, S., Roberts, C.J. and Soultanas, P. (2004). The *Bacillus subtilis* DnaD protein: a putative link between DNA remodeling and initiation of DNA replication. *FEBS Lett* 577, 460-464.

Uversky, V.N. (2013). The most important thing is the tail: multitudinous functionalities of intrinsically disordered protein termini. *FEBS Lett* 587, 1891-1901.

Val, M.E., Kennedy, S.P., El Karoui, M., Bonne, L., Chevalier, F. and Barre, F.X. (2008). FtsK-dependent dimer resolution on multiple chromosomes in the pathogen *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet* 4, e1000201.

van den Ent, F. and Lowe, J. (2000). Crystal structure of the cell division protein FtsA from *Thermotoga maritima*. *EMBO J* 19, 5300-5307.

van Stokkum, I.H., Spoelder, H.J., Bloemendal, M., van Grondelle, R. and Groen, F.C. (1990). Estimation of protein secondary structure and error analysis from circular dichroism spectra. *Anal Biochem* 191, 110-118.

Vaughan, S., Wickstead, B., Gull, K. and Addinall, S.G. (2004). Molecular evolution of FtsZ protein sequences encoded within the genomes of archaea, bacteria and eukaryota. *J Mol Evol* 58, 19-29.

Velten, M., McGovern, S., Marsin, S., Ehrlich, S.D., Noirot, P. and Polard, P. (2003). A two-protein strategy for the functional loading of a cellular replicative DNA helicase. *Mol Cell* 11, 1009-1020.

Vlamakis, H., Chai, Y., Beauregard, P., Losick, R. and Kolter, R. (2013). Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat Rev Microbiol* 11, 157-168.

Vlcek, C. and Paces, V. (1986). Nucleotide sequence of the late region of *Bacillus phage* ϕ 29 completes the 19,285-bp sequence of ϕ 29 genome. Comparison with the homologous sequence of phage PZA. *Gene* 46, 215-225.

Ward, J.J., Sodhi, J.S., McGuffin, L.J., Buxton, B.F. and Jones, D.T. (2004). Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life. *J Mol Biol* 337, 635-645.

Wattenberg, B. and Lithgow, T. (2001). Targeting of C-terminal (tail)-anchored proteins: understanding how cytoplasmic activities are anchored to intracellular membranes. *Traffic* 2, 66-71.

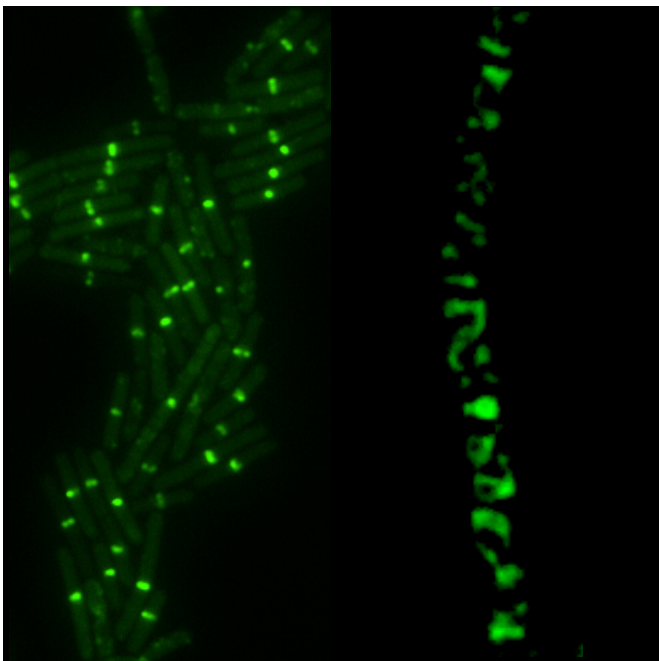
Webb, C.D., Graumann, P.L., Kahana, J.A., Teleman, A.A., Silver, P.A. and Losick, R. (1998). Use of time-lapse microscopy to visualize rapid movement of the replication origin region of the chromosome during the cell cycle in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 28, 883-892.

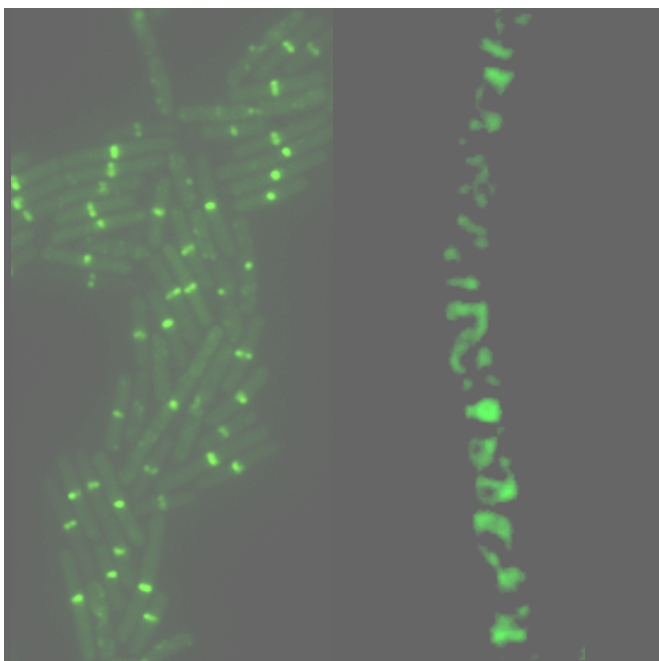
- Webb, C.D., Teleman, A., Gordon, S., Straight, A., Belmont, A., Lin, D.C., Grossman, A.D., Wright, A. and Losick, R. (1997). Bipolar localization of the replication origin regions of chromosomes in vegetative and sporulating cells of *B. subtilis*. *Cell* 88, 667-674.
- Weiss, D.S. (2004). Bacterial cell division and the septal ring. *Mol Microbiol* 54, 588-597.
- Whitmore, L. and Wallace, B.A. (2004). DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res* 32, W668-673.
- Whitmore, L. and Wallace, B.A. (2008). Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers* 89, 392-400.
- Wilce, J.A., Vivian, J.P., Hastings, A.F., Otting, G., Folmer, R.H., Duggin, I.G., Wake, R.G. and Wilce, M.C. (2001). Structure of the RTP-DNA complex and the mechanism of polar replication fork arrest. *Nat Struct Biol* 8, 206-210.
- Wright, P.E. and Dyson, H.J. (1999). Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J Mol Biol* 293, 321-331.
- Wu, L.J. and Errington, J. (2004). Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis*. *Cell* 117, 915-925.
- Wu, L.J. and Errington, J. (2012). Nucleoid occlusion and bacterial cell division. *Nat Rev Microbiol* 10, 8-12.
- Wu, L.J., Ishikawa, S., Kawai, Y., Oshima, T., Ogasawara, N. and Errington, J. (2009). Noc protein binds to specific DNA sequences to coordinate cell division with chromosome segregation. *EMBO J* 28, 1940-1952.
- Xue, B., Dunker, A.K. and Uversky, V.N. (2012). Orderly order in protein intrinsic disorder distribution: disorder in 3500 proteomes from viruses and the three domains of life. *J Biomol Struct Dyn* 30, 137-149.
- Yanouri, A., Daniel, R.A., Errington, J. and Buchanan, C.E. (1993). Cloning and sequencing of the cell division gene *pbpB*, which encodes penicillin-binding protein 2B in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 175, 7604-7616.
- Zaballos, A., Lázaro, J.M., Méndez, E., Mellado, R.P. and Salas, M. (1989). Effects of internal deletions on the priming activity of the phage ϕ 29 terminal protein. *Gene* 83, 187-195.
- Zhang, W., Allen, S., Roberts, C.J. and Soutanas, P. (2006). The *Bacillus subtilis* primosomal protein DnaD untwists supercoiled DNA. *J Bacteriol* 188, 5487-5493.

Zhang, W., Carneiro, M.J., Turner, I.J., Allen, S., Roberts, C.J. and Soultanas, P. (2005). The *Bacillus subtilis* DnaD and DnaB proteins exhibit different DNA remodelling activities. *J Mol Biol* 351, 66-75.

Zhang, W., Machon, C., Orta, A., Phillips, N., Roberts, C.J., Allen, S. and Soultanas, P. (2008). Single-molecule atomic force spectroscopy reveals that DnaD forms scaffolds and enhances duplex melting. *J Mol Biol* 377, 706-714.

Zhou, B., Liu, J., Wang, Q., Liu, X., Li, X., Li, P., Ma, Q. and Cao, C. (2008). The nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus inhibits cell cytokinesis and proliferation by interacting with translation elongation factor 1 α . *J Virol* 82:6962-6971.





Material suplementario

Tabla S1. Estirpes utilizadas.

Estirpe	Genotipo relevante ^a	Construcción, origen o referencia ^c
<i>E. coli</i>		
DH5 α	$\phi 80dlacZ\Delta M15$, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrAB</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (r_K^- , m_K^+), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , $\Delta(lacZYA-argF)$ U169, <i>phoA</i>	Stock del laboratorio
XL1-blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (r_K^- , m_K^+), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , [F', <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q $\Delta M15::Tn10(tet^r)$]	Stock del laboratorio
BL21(DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (r_B^- , m_B^-), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , λ (DE3)	Stock del laboratorio
BL21-p1AC11	BL21(DE3) que contiene el plásmido pT7-3/p1AC11	pT7-3/p1AC11 \rightarrow BL21(DE3) (Amp)
BL21-p1	BL21(DE3) que contiene el plásmido pT7sF6w con el gen <i>l</i> de $\phi 29$	Stock del laboratorio
<i>B. subtilis</i>		
168	<i>trpC2</i> , considerada estirpe silvestre	B.G.S.C. ^b
SWV215	<i>trpC2 pheA1</i> $\Omega(spo0A::kan)$	Xu and Strauch (1)
168 $\Delta spo0A$	<i>trpC2</i> $\Omega(spo0A::kan)$	SWV215 \rightarrow 168 (Km)
168/YFP-p1	<i>trpC2</i> $\Omega(amyE::P_{xyl-yfp-p1} spc)$	pSG5472/YFP-p1 \rightarrow 168 (Sp)
DBP-001	<i>trpC2</i> $\Omega(amyE::P_{xyl-yfp-p1} spc)$ $\Omega(spo0A::kan)$	SWV215 \rightarrow 168/YFP-p1
1057	<i>trpC2</i> $\Omega(amyE::P_{xyl-ftsZ-cfp} spc)$	Feucht and Lewis (2)
DBP-002	<i>trpC2</i> $\Omega(amyE::P_{xyl-yfp-p1} spc)$ $\Omega(thrC::P_{hyper-spank-ftsZ-cfp} erm)$	pSG5472/YFP-p1, pDP150/FtsZ-CFP \rightarrow 168 (Sp, Erm)
1801	<i>trpC2 chr::pJSIZApble</i> ($P_{spac-ftsZ ble}$)	Marston <i>et al.</i> (3)
DBP-003	<i>trpC2 chr::pJSIZApble</i> ($P_{spac-ftsZ ble}$) $\Omega(amyE::P_{xyl-yfp-p1} spc)$	pSG5472/YFP-p1 \rightarrow 1801 (Sp)
804	<i>trpC2</i> $\Omega(ftsL::pSG441 aphA-3 P_{spac-pbpB neo})799(\phi 105J506)$ <i>cat P_{xyl-ftsL}</i>	Daniel <i>et al.</i> (4)
DBP-004	<i>trpC2</i> $\Omega(ftsL::pSG441 aphA-3 P_{spac-pbpB neo})799(\phi 105J506)$ <i>cat P_{xyl-ftsL}</i> $\Omega(amyE::P_{xyl-yfp-p1} spc)$	pSG5472/YFP-p1 \rightarrow 804 (Sp)
168ftsZHis	<i>trpC2</i> $\Omega(ftsZ::pMUTinHis\Delta ftsZ)$	Ishikawa <i>et al.</i> (5)
168His	<i>trpC2</i> $\Omega(ftsZ::pMUTinHis\Delta ftsZ)$ $\Omega(spo0A::kan)$	SWV215 \rightarrow 168ftsZHis (Km)
DBP-005	<i>trpC2</i> $\Omega(thrC::P_{hyper-spank-p1} erm)$	pDP150/p1 \rightarrow 168 (Erm)
DM-024	<i>trpC2</i> $\Omega(thrC::P_{hyper-spank-cfp} erm)$	Muñoz-Espín <i>et al.</i> (6)
JH642	<i>trpC2 pheA1</i>	Perego <i>et al.</i> (7)
PL1780	JH642 <i>ezrA::ezrA(R510D) spc</i>	Haeusser <i>et al.</i> (8)
DBP-006	<i>trpC2 pheA1</i> $\Omega(spo0A::kan)$	SWV215 \rightarrow JH642 (Km)
DBP-007	JH642 <i>ezrA::ezrA(R510D) spc</i> $\Omega(spo0A::kan)$	SWV215 \rightarrow PL1780 (Km)
110NA	<i>trpC2 spo0A⁻ su⁻</i>	Moreno <i>et al.</i> (9)
110NA/pPR54	110NA que contiene el plásmido pPR54	Serrano-Heras <i>et al.</i> (10)
110NA/p1	110NA que contiene el plásmido pPR53/p1	Stock del laboratorio
110NA/p1AC2	110NA que contiene el plásmido pPR53/p1AC2	pPR53/p1AC2 \rightarrow 110NA (Ph y Neo)
110NA/p1AC5	110NA que contiene el plásmido pPR54/p1AC5	pPR54/p1AC5 \rightarrow 110NA (Ph)
110NA/p1AC11	110NA que contiene el plásmido pPR54/p1AC11	pPR54/p1AC11 \rightarrow 110NA (Ph)
YB886	<i>trpC2</i> , <i>metB10</i> , <i>xin-1</i> , $SP\beta^-$	Yasbin <i>et al.</i> (11)
MO-99	<i>spo0A⁻</i> , <i>su⁺3</i>	Moreno <i>et al.</i> (9)
DM-001	<i>trpC2</i> $\Omega(neo3427)\Delta mreB$ $\Omega(spo0A::erm)$	Muñoz-Espín <i>et al.</i> (12)
DM-002	<i>trpC2</i> $\Omega(mbl::spc)$ $\Omega(spo0A::erm)$	Muñoz-Espín <i>et al.</i> (12)
DM-003	<i>trpC2</i> $\Omega(mreBH::cat)$ $\Omega(spo0A::erm)$	Muñoz-Espín <i>et al.</i> (12)

a. Abreviaturas de los genes de resistencia a antibióticos: *neo*, neomicina; *spc*, espectinomina; *kan*, kanamicina; *erm*, eritromicina; *cat*, cloranfenicol.

b. Bacillus Genetic Stock Center

c. “X” \rightarrow “Y” indica que la estirpe Y ha sido transformada con DNA proveniente de X, con los marcadores de selección entre paréntesis.

Amp: ampicilina; Sp, espectinomina; Em, eritromicina; Km, kanamicina; Ph, fleomicina; Neo, neomicina.

- (1) Xu, K. and Strauch, M.A. (1996) Identification, sequence, and expression of the gene encoding gamma-glutamyltranspeptidase in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 178:4319-4322.
- (2) Feucht, A. and Lewis, P.J. (2001) Improved plasmid vectors for the production of multiple fluorescent protein fusions in *Bacillus subtilis*. *Gene* 264(2):289-297.
- (3) Marston, A.L., Thomaides, H.B., Edwards, D.H., Sharpe, M.E. and Errington, J. (1998) Polar localization of the MinD protein of *Bacillus subtilis* and its role in selection of the mid-cell division site. *Genes Dev* 12(21):3419-3430.
- (4) Daniel, R.A., Harry, E.J., Katis, V.L., Wake, R.G. and Errington, J. (1998) Characterization of the essential cell division gene *ftsL(yIID)* of *Bacillus subtilis* and its role in the assembly of the division apparatus. *Mol Microbiol* 29(2):593-604.
- (5) Ishikawa, S., Kawai, Y., Hiramatsu, K., Kuwano, M. and Ogasawara, N. (2006) A new FtsZ-interacting protein, YlmF, complements the activity of FtsA during progression of cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 60(6):1364-1380.
- (6) Muñoz-Espín, D., Holguera, I., Ballesteros-Plaza, D., Carballido-López, R. and Salas, M. (2010) Viral terminal protein directs early organization of phage DNA replication at the bacterial nucleoid. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(38):16548-16553.
- (7) Perego, M., Spiegelman, G.B. and Hoch, J.A. (1988) Structure of the gene for the transition state regulator *abrB*: regulator synthesis is controlled by the *spo0A* sporulation gene in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 2:689-699.
- (8) Haeusser, D.P., Garza, A.C., Buscher, A.Z. and Levin, P.A. (2007) The division inhibitor EzrA contains a seven-residue patch required for maintaining the dynamic nature of the medial FtsZ ring. *J Bacteriol* 189:9001-9010.
- (9) Moreno, F., Camacho, A., Viñuela, E. and Salas, M. (1974) Suppressor-sensitive mutants and genetic map of *Bacillus subtilis* bacteriophage $\phi 29$. *Virology* 62:1-16.
- (10) Serrano-Heras, G., Salas, M. and Bravo, A. (2005). A new plasmid vector for regulated gene expression in *Bacillus subtilis*. *Plasmid* 54:278-282.
- (11) Yasbin, R.E., Fields, P.I. and Andersen, B.J. (1980). Properties of *Bacillus subtilis* 168 derivatives freed of their natural prophages. *Gene* 12:155-159.
- (12) Muñoz-Espín, D., Daniel, R., Kawai, Y., Carballido-López, R., Castilla-Llorente, V., Errington, J., Meijer, W.J. and Salas, M. (2009). The actin-like MreB cytoskeleton organizes viral DNA replication in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:13347-13352.

Tabla S2. Bacteriófagos usados.

Fago	Origen o referencia
φ29 silvestre	Stock del laboratorio
φ29 <i>susI4</i> (1242)	Jiménez <i>et al.</i> (1)
φ29 <i>susI</i> (629)	Reilly <i>et al.</i> (2)
φ29 <i>susI6.7</i> (48)/ <i>susI4</i> (1242)	Meijer <i>et al.</i> (3)

- (1) Jiménez, F., Camacho, A., De La Torre, J., Viñuela, E. and Salas, M. (1977) Assembly of *Bacillus subtilis* phage φ29. 2. Mutants in the cistrons coding for the non-structural proteins. *Eur J Biochem* 73(1): 57-72
- (2) Reilly, B.E., Zeece, V.M. and Anderson, D.L. (1973) Genetic study of suppressor-sensitive mutants of the *Bacillus subtilis* bacteriophage φ29. *J Virol* 11(5): 756-760
- (3) Meijer, W.J., Serna-Rico, A. and Salas, M. (2001). Characterization of the bacteriophage φ29-encoded protein p16.7: a membrane protein involved in phage DNA replication. *Mol Microbiol* 39: 731-746.

Tabla S3. Plásmidos usados

Plásmidos	Características relevantes	Referencia
pSG5472	Derivado de pSG1729 que contiene el gen <i>yfpmut2</i> en vez de <i>gfpmut1</i>	Muñoz-Espín <i>et al.</i> (1)
pSG5472/YFP-p1	pSG5472 que contiene la fusión <i>yfp::p1</i>	Este trabajo
pDP150	Vector integrativo en el locus <i>thrC</i> con el promotor <i>P_{hyper-spank}</i>	Kearns and Losick (2)
	Derivado de pDR111	
pDP150/FtsZ-CFP	pDP150 que contiene la fusión <i>ftsZ::cfp</i>	Este trabajo
pDP150/p1	pDP150 que contiene el gen <i>I</i> de φ29	Este trabajo
pT7-3/p1ΔC11	pT7-3 que contiene la secuencia <i>IΔC11</i>	Este trabajo
pPR53	Derivado del plásmido pUB110	Stock del laboratorio
pPR53-p1	pPR53 que contiene el gen <i>I</i> del fago φ29	Stock del laboratorio
pPR53-p1ΔC2	pPR53 que contiene la secuencia <i>IΔC2</i>	Este trabajo
pPR54	Derivado del pPR53. Contiene el gen <i>cI857</i> que codifica un represor termosensible del promotor <i>P_R</i>	Serrano-Heras <i>et al.</i> (3)
pPR54-p1ΔC5	pPR54 que contiene la secuencia <i>IΔC5</i>	Este trabajo
pPR54-p1ΔC11	pPR54 que contiene la secuencia <i>IΔC11</i>	Este trabajo
pKT25	vector de fusión C-terminal	Karimova <i>et al.</i> (4)
p25N	vector de fusión N-terminal	Karimova <i>et al.</i> (4)
pUT18	vector de fusión N-terminal	Karimova <i>et al.</i> (4)
pUT18C	vector de fusión C-terminal	Karimova <i>et al.</i> (4)

- (1) Muñoz-Espín, D., Holguera, I., Ballesteros-Plaza, D., Carballido-López R and Salas, M. (2010) Viral terminal protein directs early organization of phage DNA replication at the bacterial nucleoid. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(38):16548-16553.
- (2) Kearns, D.B. and Losick, R. (2005) Cell population heterogeneity during growth of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* 19:3083-3094.
- (3) Serrano-Heras, G., Salas, M. and Bravo, A. (2005). A new plasmid vector for regulated gene expression in *Bacillus subtilis*. *Plasmid* 54:278-282.
- (4) Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A. and Ladant, D. (1998). A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:5752-5756.